

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Anorganická chemie



Bc. Jakub Šrein

Reaktivita a vlastnosti analog trifosfátu
Reactivity and properties of triphosphate analogues

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: doc. RNDr. Vojtěch Kubiček, PhD.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 21. 8. 2017

Podpis:

Jakub Šrein

Obsah

ABSTRAKT	3
ABSTRACT.....	4
I. ÚVOD	5
I.1 ZÁKLADNÍ SLOUČENINY FOSFORU	5
I.1.1 Kyselina fosforečná.....	5
I.1.2 Fosfonáty.....	5
I.1.3 Fosfináty	5
I.1.4 Fosfiny a fosfinoxidy.....	6
I.2 BIS(FOSFONOVÉ) KYSELINY	7
I.2.1 Pyrofosfát.....	7
I.2.2 Průmyslové využití bis(fosfonátů)	8
I.2.3 Afinity bis(fosfonátů) ke kostní tkáni	8
I.3 BIS(FOSFONÁTY) JAKO LÉČIVA	9
I.3.1 Ovlivňování kalcifikace a resorpce kostní tkáně in vivo.....	9
I.3.2 Biologická aktivita bis(fosfonátů) druhé generace	10
I.3.3 Bis(fosfonáty) jako látky pro radioterapii kostní tkáně	11
I.4 ANALOGA TRIFOSFÁTU.....	12
I.4.1 Role trifosfátu v organismu.....	12
I.4.2 Organofosforový analog kyseliny trifosforečné.....	13
I.4.3 Syntéza látek se strukturou PCPCP.....	14
I.4.4 Funkcionalizace methylenových můstků geminálních bis(fosfonátů)	17
I.5 CÍL PRÁCE.....	21
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
II.1.1 Chemikálie	22
II.2 EXPERIMENTÁLNÍ METODY.....	22
II.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	22
II.2.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	22
II.2.3 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	22
II.2.4 Rentgenová difrakce na monokrystalu.....	22
II.2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	23
II.2.6 FLASH chromatografie.....	23

II.2.7	Kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie (LC-MS).....	24
II.2.8	Potenciometrie	24
II.2.9	Vyhodnocování potenciometrických měření	26
II.2.10	NMR titrace.....	26
II.3	SYNTEZA	26
II.3.1	Pentatehylester kyseliny bis(methylenfosfonáto)fosfinové Et_5L^1	26
II.3.2	Kyselina bis(methylenfosfonáto)fosfinová H_5L^1	27
II.3.3	Dianilinium bis(fosfonáto)fosfinát, monohydrát.....	27
II.3.4	Ethylester kyseliny bis((difenyfosfinoxid)methylen)fosfinové EtL^2	28
II.3.5	Kyselina bis((difenyfosfinoxid)methylen)fosfinová HL^2	28
II.3.6	α,α' -dibrom-o-xylen	29
II.3.7	Cyklizace Et_5L^1	29
II.3.8	Cyklizace EtL^2	29
II.3.9	Cyklizace Et_5L^1 aldehydem s $TiCl_4$	30
III.	DISKUZE	31
III.1	CYKLIZACE LÁTEK SE STRUKTURNÍM MOTIVEM PCPCP	31
III.1.1	Syntéza struktur PCPCP s pětičlenným kruhem	32
III.1.2	Syntéza struktur PCPCP s šestičlenným kruhem	33
III.1.3	Cyklizace Et_5L^1 pomocí α,α' -dibrom-o-xylenu	39
III.1.4	Cyklizace pomocí acetylacetonu	40
III.2	STUDIE LÁTEK H_5L^1 A HL^2 V PEVNÉM STAVU	40
III.2.1	Struktura monohydrátu dianilinium bis(methylenfosfonáto)fosfinátu	41
III.2.2	Struktura kyseliny HL^2	42
III.3	POTENCIOMETRICKÉ STUDIE H_5L^1	45
III.3.1	Stanovení disociačních konstant H_5L^1	45
III.3.2	Interakce H_5L^1 s lithnými kationty v roztoku	47
III.3.3	Interakce H_5L^1 s vápenatými kationty v roztoku	48
III.3.4	Interakce H_5L^1 s měďnatými kationty v roztoku	49
III.3.5	Interakce H_5L^1 se zinečnatými kationty v roztoku.....	50
III.3.6	Interakce H_5L^1 s ethylendiaminem.....	51
IV.	ZÁVĚR.....	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56

Název: Reaktivita a vlastnosti analog trifosfátu

Řešitel: Bc. Jakub Šrein

Ústav: Katedra anorganické chemie

Školitel: doc. RNDr. Vojtěch Kubiček, PhD.

E-mail školitele: kubicek@natur.cuni.cz

Abstrakt

V této práci byly zkoumány reakce vedoucí k uzavírání kruhů přes methylenové můstky ve strukturách obsahujících motiv PCPCP. Bylo zjištěno, že při těchto reakcích vzniká velké množství izomerů. Některé tyto izomery se podařilo charakterizovat pomocí NMR a MS spektroskopie. Směsi izomerů se nepodařilo rozdělit, a proto u většiny nebyla zjištěna absolutní konfigurace

Dále byly provedeny potenciometrické titrace kyseliny bis(methylenfosfonáto)fosfinové. Kromě upřesnění disociačních konstant byly zkoumány interakce s lithnými, vápenatými, měďnatými a zinečnatými ionty. Pomocí potenciometrické a NMR titrace byla zkoumána interakce bis(methylenfosfonáto)fosfinové kyseliny s ethylendiaminem. Výsledky ukazují vznik aduktů vázaných vodíkovou vazbou.

Title: Reactivity and properties of triphosphate analogues

Author: Bc. Jakub Šrein

Department: Department of Inorganic Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, PhD.

Supervisor's e-mail: kubicek@natur.cuni.cz

Abstract

Reactions leading to cyclization on methylene bridges in PCPCP structure motif were investigated. It was found, that these reactions result in number of various isomers. Some of these isomers were characterized by NMR and MS spectroscopy, but none was isolated.

Further, acid-base properties of bis(methylenephosphonato)phosphineic acid were investigated. Formation of complexes was studied with lithium(I), calcium(II), copper(II) and zinc(II) cations. Furthermore, interaction between bis(methylenephosphonato)phosphinic acid and ethylenediamine was investigated by NMR and potentiometric titration. The results show formation of H-bond-based adducts.

I. Úvod

I.1 Základní sloučeniny fosforu

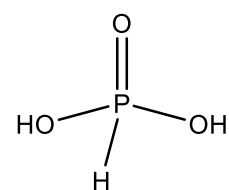
I.1.1 Kyselina fosforečná

Jedna z nejznámějších sloučenin fosforu s kyslíkem je kyselina trihydrogenfosforečná. Používá se jako potravinářské aditivum, nachází použití jako elektrolyt, v metalurgii se vyskytuje jako tavidlo a fosfáty (soli kyseliny fosforečné) patří k nejvýznamnějším průmyslovým hnojivům.

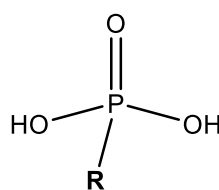
Fosfátový anion $(\text{PO}_4)^{3-}$ se objevuje v základních pochodech souvisejících s živou přírodou. Tato částice tvoří spolu s cukry a heterocyklickými bázemi obsahujícími dusík základ struktury nukleových kyselin. Makroergní polyfosfátová skupina je nedílnou součástí cyklu molekuly ATP, který je významným energií transportujícím cyklem v živých organismech, pyrofosfát (difosfát) je důležitou sloučeninou v krevním řečišti, kde zabraňuje srážení kationtů, především vápenatých a hořečnatých. Ze stejného důvodu hraje pyrofosfát také důležitou roli v životním cyklu kostní tkáně, a to jak při jejím rozpouštění, tak při její výstavbě.

I.1.2 Fosfonáty

Nahrazením jedné z hydroxylových skupin kyseliny fosforečné atomem vodíku vzniká kyselina fosforitá se sumárním vzorcem H_3PO_3 (obr. 1.1). Dále jsou známy organické sloučeniny, které jsou z ní odvozeny náhradou atomu vodíku uhlíkatým řetězcem. Tyto kyseliny jsou nazývány fosfonové a často se používají jako fungicidy, herbicidy a pro úpravu vody ve formě svých solí, fosfonátů.



Kyselina fosforitá

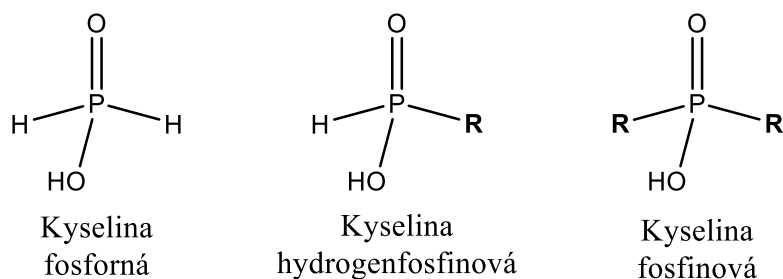


Kyselina fosfonová

Obr. 1.1: Záměna atomu vodíku v kyselině fosforité

I.1.3 Fosfináty

Nahrazením dvou hydroxylových skupin kyseliny fosforečné atomy vodíku vzniká kyselina fosforová. Podobně jako u kyseliny fosforité je možné nahradit atomy vodíku organickými řetězci (obr. 1.2). Dvě řady těchto organických kyselin se označují jako kyseliny hydrogenfosfinové a fosfinové.



Obr. 1.2: Organické deriváty kyseliny fosforové

I.1.4 Fosfíny a fosfinoxidy

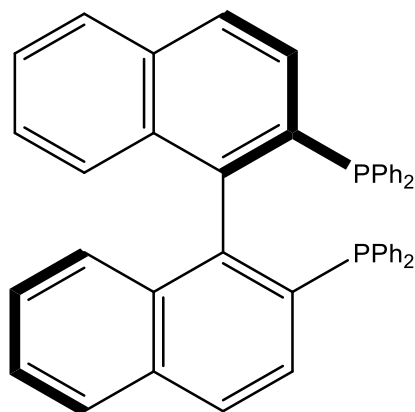
Fosfíny se od kyselin fosforu liší valencí. Na rozdíl od stabilní pětivazné formy fosforu, známé z oxokyselin či oxidů, se fosfor ve fosfinech nachází v konfiguraci třívazné s formálním oxidačním číslem $-III$. Fosfíny jako skupina jsou odvozeny z molekuly fosfanu PH_3 a vznikají postupnou náhradou atomů vodíku za organické řetězce, podobně jako jsou aminy odvozeny z amoniaku NH_3 . Na rozdíl od aminů vykazují fosfíny silnou afinitu ke kyslíku a velmi snadno se oxidují na fosfinoxidy R_3PO .

Volný elektronový pár na fosforu dává fosfinům schopnost koordinovat kovy. Jejich koordinační vlastnosti je možné snadno ovlivňovat pomocí substituentů na organických částech molekuly a zároveň je možné relativně snadno připravovat různé polyfosfíny s odlišnými *cone*^{*}- a *bite*[†]-úhly. Fosfíny jako takové se zařazují mezi tzv. ligandy měkké, tedy ligandy koordinující měkké kovy, jako je např. platina, paladium či ruthenium. Tyto kovy spojuje nízká povrchová hustota náboje. Komplexy těchto kovů slouží často jako katalyzátory organických reakcí. Účinnost i specifitu (např. poměry vznikajících izomerů) katalyzátoru lze ovlivnit koordinací různých ligandů na kov. Koordinační vlastnosti, které jsou ovlivněné především elektronovou hustotou na atomu fosforu a geometrickým uspořádáním molekuly ligandu spolu s mnoha možnostmi jejich přípravy vedly k syntéze mnoha různých, často velmi komplikovaných polyfosfinů s cílem vylepšit katalytické vlastnosti těžkých kovů. Jedním z takových ligandů je například ligand BINAP (obr. 1.3), používaný v Noyoriho asymetrické hydrogenaci, používané např. při přípravě levofloxacinu[‡], ve které dochází k enantioselektivní hydrogenaci ketonové skupiny.

^{*} Úhel popisující kužel obsazený ligandem v koordinační sféře atomu kovu, popisuje sterickou náročnost ligandu

[†] Úhel závisející na geometrii a stavbě ligandu, nejčastěji se udává pro bidentátní ligandy, kde popisuje úhel svíraný mezi chelatujícími donorovými atomy a atomem koordinovaného kovu.

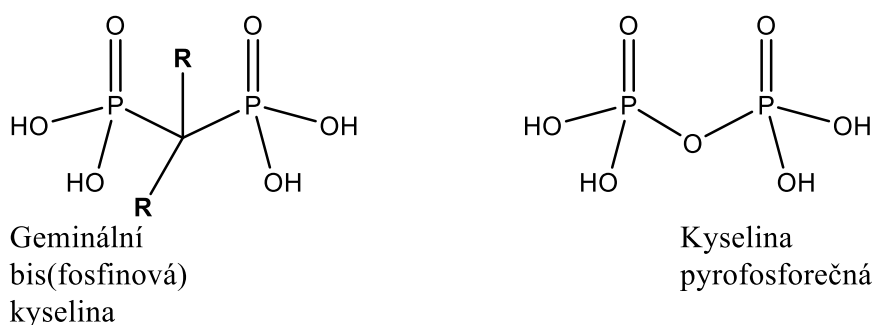
[‡] Antibiotikum předepisované např. v případech zápalu plic či zánětů močových cest.



Obr. 1.3: (R)-BINAP, ligand pro Noyoriho asymetrickou hydrogenaci^[1]

I.2 Bis(fosfonové) kyseliny

Bis(fosfonové) kyseliny jsou dnes velmi studovanými látkami, především v oblasti medicíny. Bis(fosfonové) kyseliny vznikají spojením dvou kyselin fosfonových přes jejich organické řetězce. Speciálním případem bis(fosfonových) kyselin jsou geminální bis(fosfonové) kyseliny (obr. 1.4). Jedná se o speciální případ, kdy se mezi fosfonovými skupinami nachází pouze jeden atom uhlíku (methylenový můstek). Tyto sloučeniny jsou strukturně podobné pyrofosfátu.



Obr. 1.4: Sloučeniny obsahující dvě geminální fosfonové skupiny

I.2.1 Pyrofosfát

Významnou molekulou obsahující fosfor vyskytující se v organismech je pyrofosfát, v biochemii označovaný zkratkou PP_i . Z pohledu anorganického chemika se jedná o aniont kyseliny difosforečné nebo též difosfát. Tato relativně malá částice hraje v lidském organismu několik rolí. Jedna z nich souvisí s koordinačními schopnostmi dvou blízkých fosforylových skupin. Pyrofosfát lze nalézt ve tkáních obsahujících vápenaté kationty, které koordinuje, a zabraňuje tak srážení nerozpustných vápenatých solí. Tento jev je pozorovatelný v ledvinách a dalších částech vylučovací soustavy, v krevním řečišti (pyrofosfát je součástí krevní plazmy) a také v mezibuněčné tekutině.^[2]

Pyrofosfát se také vyskytuje v buněčných procesech. Během elongace DNA enzymem polymerázou I přistupují ke vznikajícímu vlákně DNA molekuly jednotlivých bází ve formě trifosfátu deoxynukletidu (tedy báze vázané na deoxyribózu s trifosfátovou skupinou na pátém atomu uhlíku). Trifosfát se během této reakce rozpadá za první jednotkou, která zůstává v kostře vznikající molekuly DNA. Odštěpená molekula pyrofosfátu se dále hydrolyzuje a toto štěpení makroergní vazby způsobuje, že sekvence reakcí vedoucí k prodlužování DNA je ireverzibilní.^[3]

Další, neméně významná role pyrofosfátu v organismu souvisí s výstavbou kostní tkáně. Anorganická část je totiž tvořena minerálem zvaným hydroxyapatit se sumárním vzorcem $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Přítomnost pyrofosfátu ovlivňuje mineralizaci (přechod amorfního hydroxyapatitu na krystalický), působí jako inhibitor kalcifikace a resorpce kostní tkáně.^[4]

I.2.2 *Průmyslové využití bis(fosfonátů)*

Bis(fosfonáty) byly poprvé syntetizovány v 19. století. Dříve než došlo k objevu jejich biologických vlastností, byly používány jako přípravky pro úpravu vody a ochranu zařízení před vylučováním nerozpustných sloučenin obsahujících vápník či hořčík. Nahrazení kyslíkaté vazby pyrofosfátu organickým řetězcem (případně methylenovým můstkem) vede k nehydrolyzovatelnosti molekuly, a tedy jejímu možnému použití proti korozi a vytváření vodního kamene, například v pracích prostředcích. Dnes jsou však bis(fosfonáty) spojovány především s medicínou a jejich afinitou ke kostní tkáni.^[5]

I.2.3 *Afinita bis(fosfonátů) ke kostní tkáni*

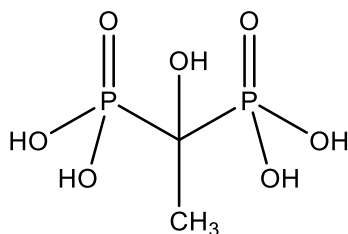
K objevu medicínsky využitelných biologických vlastností bis(fosfonátů) došlo v 70. letech, při hledání alternativy pyrofosfátu, který byl kvůli své hydrolyzovatelnosti použitelný pouze při odstraňování zubního kamene. Afinita pyrofosfátu k hydroxyapatitu, který se s výjimkou patogenních kalcifikací vyskytuje pouze v kostní tkáni, vedla k hledání alternativních látek s podobnou biologickou aktivitou. Jako takové se ukázaly právě bis(fosfonáty), jejichž odolnost proti enzymatické hydrolýze prodloužila jejich *in vivo* životnost na dobu, během které mohly tyto látky začít ovlivňovat biologické dění na kostech.^[6]

Samotná absorpce bis(fosfonátů) na kostní tkáň je komplikovanou záležitostí a závisí na několika faktorech. Prvním z nich je pouhá schopnost těla dopravit látku ke kostní tkáni a také na prokrvení dané tkáně. Některé druhy rakovinných bujení zvyšují množství absorbované látky jen svou zvýšenou prokrveností ve srovnání s okolní tkání. Absorpce záleží také na funkčních skupinách přítomných v organické části bis(fosfonátů) a v neposlední řadě i na

složení tkáně, především na poměru krystalického a amorfního hydroxyapatitu, které se mění se stářím kosti.^[7]

I.3 Bis(fosfonáty) jako léčiva

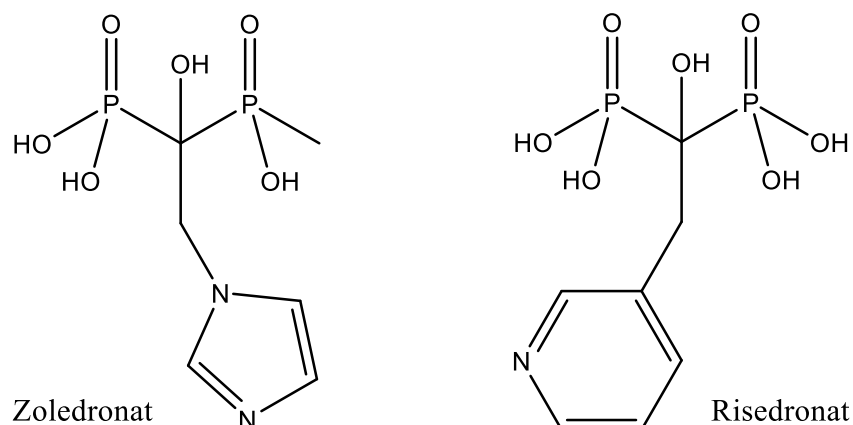
Po objevu jednoho z prvních bis(fosfonátů), Etidronatu (obr. 1.5), se objevily myšlenky na jejich použití jako léků potlačujících nepřírozenou kalcifikaci (kostnatění) měkkých tkání. Výsledky testů se však ukázaly jako nedostatečně průkazné. Dalším problémem s nasazením těchto látek byla jejich nedostatečná specifita. Kromě inhibice kalcifikace měkkých tkání vykazovali pacienti také sníženou schopnost mineralizace tvrdých tkání, které vedlo až k zhoršené hojivosti kostní tkáně v případě zlomenin. Bis(fosfonáty) s těmito vlastnostmi nakonec našly použití pouze v zubních pastách jako prevence vzniku zubního kamene.^[4]



Obr. 1.5: Etidronat, potenciální léčivo pro ektopickou kalcifikaci

I.3.1 Ovlivňování kalcifikace a resorpce kostní tkáně *in vivo*

Biologický efekt bis(fosfonátů) na kostní tkáň je podle současných závěrů dvojitý. Na molekulární úrovni působí inhibitor rozpouštění hydroxyapatitu. Navázání probíhá záměnou fosfonátových skupin za fosforečnanové anionty přirozeně přítomné v kosti. Tato vazba je stabilnější a přítomnost molekul léčiva na povrchu zpomaluje přístup molekul vody ke tkáni. Síla této vazby, (a tedy i afinita a poločas desorpce léčiva) záleží velmi významně na struktuře postranních řetězců bis(fosfonátů). Bylo prokázáno, že přítomnost hydroxylových skupin zvyšuje afinitu ke kostní tkáni a přítomnost heterocyklů obsahujících atom dusíku zvyšuje stabilitu vzniklého agregátu léčivo-kost, například u léčiv Risedronat a Zoledronat (obr. 1.6). Efekt dusíkatých heterocyklů je připisován vzniku vodíkového můstku mezi heteroatomem a hydroxylovou skupinou přítomnou v hydroxyapatitu. Tento efekt je závislý především na vazebném úhlu.^[8]

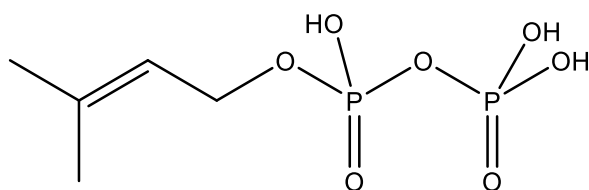


Obr 1.6: Bis(fosfonáty) obsahující dusíkatý heterocyklus.

I.3.2 Biologická aktivita bis(fosfonátů) druhé generace

Kromě ovlivňování rozpustnosti kostí působí bis(fosfonáty) také biologicky na buňky kostní tkáně. Existují tři předpokládané mechanismy, jak se látky do buněk dostávají: ve formě volné molekuly jako vápenatý komplex a nebo navázané na kosterní proteiny.^[8] Bis(fosfonáty) způsobují buněčnou smrt (apoptózu) dvěma známými způsoby, které souvisejí s přítomností atomů dusíku v postranním řetězci bis(fosfonátů). V případě bis(fosfonátových) léčiv bezdusíkatých, někdy označovaných jako první generace, dochází k navázání molekuly na nukleosidy zodpovědné za přenos energie v molekule, díky jejich podobnosti s pyrofosfátem. Hromadění těchto metabolitů vede nejprve k omezování činnosti a poté i k apoptóze osteoklastů, buněk rozpouštějících kostní tkáň.

Přípravky druhé generace, tedy atom dusíku v postranním řetězci obsahující bis(fosfonáty), působí také buněčnou smrt osteoklastů, avšak namísto hromadění nehydrolyzovatelných metabolitů dochází k inhibici enzymu farnesyl-difosfát syntáza. Tento enzym je kritický pro mevalonátový (isoprenoidový) proces, jehož produktem je dimethylallyl pyrofosfát (obr. 1.7), který je stavebním prvkem buněčných membrán.^[9] Omezováním průběhu tohoto biologického procesu způsobují bis(fosfonáty) druhé generace nejprve omezení činnosti osteoklastů a až po určité době vedou k samotné buněčné smrti.

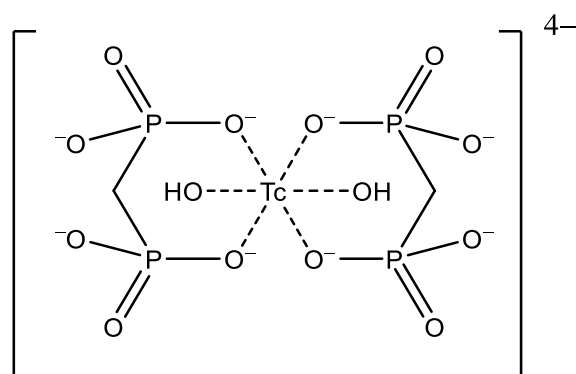


Obr 1.7: Dimethylallyl pyrofosfát

Bis(fosfonáty) druhé generace kromě způsobování buněčné smrti vedou také k aktivaci některých fenotypů $\gamma\delta$ T lymfocytů. Tyto lymfocyty jsou v organismu zodpovědné za likvidaci cizích či atypických buněk, ať už jde o buňky nádorového bujení či invazivní bakterie. I když není známo, jestli tento efekt nestojí také za ovlivňováním resorpce a výstavby kostní tkáně způsobovaném bis(fosfonáty), je zajímavou cestou k léčivům působícím přímo na kostech. Objasnění tohoto procesu by mohl dát vzniknout léčivům pro zánětlivá onemocnění kostí, případně alternativu k v současné době používaným kancerostatikům, která obsahují radioaktivní izotop kovu.^[10] Mezi efekty blokování syntézy farnesyl difosfátu a aktivací T lymfocytů pravděpodobně existuje biologická souvislost, která do dnešního dne nebyla dostatečně prokázána.

I.3.3 *Bis(fosfonáty) jako látky pro radioterapii kostní tkáně*

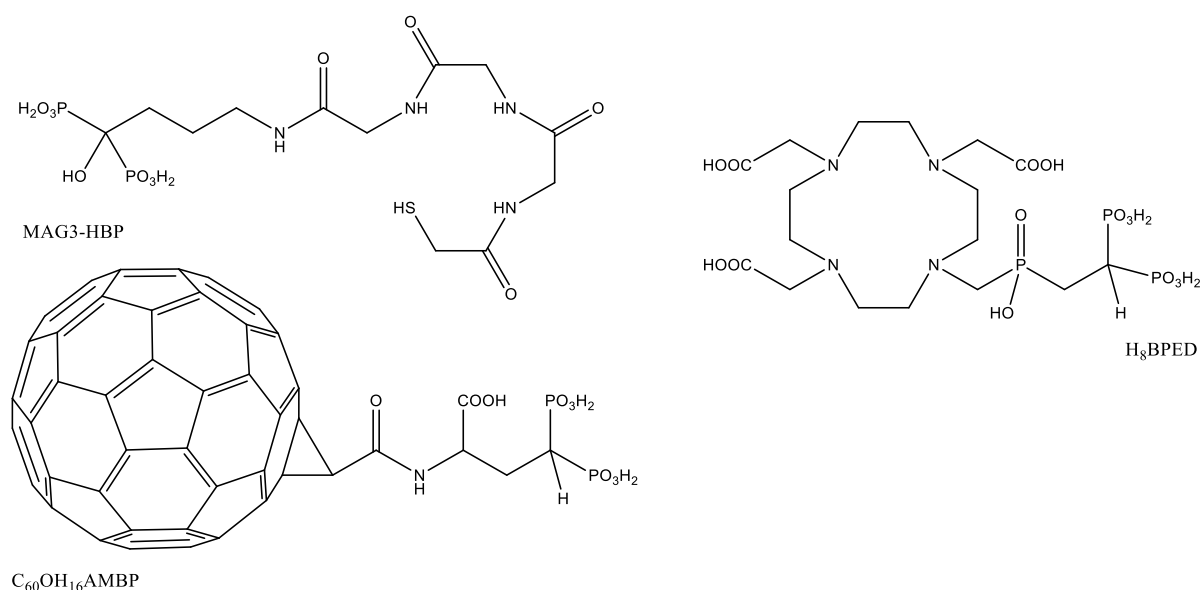
Afinita bis(fosfonátových) struktur ke kostní tkáni je využívána v radiologii a radioterapii. V těchto medicínských oborech se využívá radioaktivních izotopů kovů k zobrazování (SPECT, PET) nebo přímo k léčbě ozařováním (paliativní léčba kostních metastáz).^[11] Pro zobrazování tkáně pomocí metody SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) se používá metastabilní izotop technecia ^{99m}Tc , který vyzařuje fotony gama, které jsou snímány kamerou obíhající kolem pacienta v kruhovém tunelu. V případě zobrazování kostní tkáně se používá komplex označovaný jako ^{99m}Tc -MDP (obr 1.8). Kyselina methylenbis(fosfonová) se pevně váže na technecium a zároveň poskytuje přípravek specifitu. Tento přípravek je široce používán také díky tomu, že je možného ho připravit těsně před použitím pouhým smíšením radionuklidu a roztoku bis(fosfonátu).



Obr. 1.8: Zakomplexovaný izotop ^{99m}Tc v přípravku ^{99m}Tc -MDP

Geminální bis(fosfonátovou) skupinu je také možné použít v pendantním ramenu makrocyclu. Typickým problémem léčiv a přípravků obsahujících těžké kovy (případně jejich radioaktivní izotopy) je nespecifické ukládání v organismu. Proto je nutné tyto kovy vpravovat

do těla ve formě termodynamicky a kineticky stabilních komplexů, které si tyto vlastnosti udrží i v prostředí lidského těla, především v krevní plazmě. Kromě přímého zakomplexování bis(fosfonátem) se používají heterocykly jako jsou DOTA či DTPA. Publikována byla také molekula fullerenu obsahující bis(fosfonátovou) skupinu^[12] a látka obsahující hydroxo-methylbis(fosfonátový) fragment a komplexující thiopolyamidovou skupinu s označením MAG3-HBP^[13] (obr 1.9).



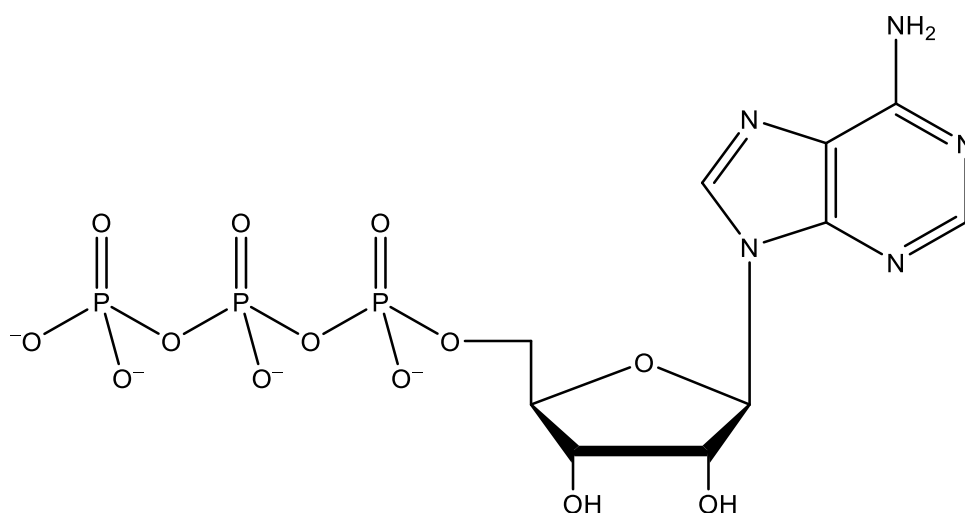
Obr. 1.9: Nosiče radioizotopů ukládající se v kostní tkáni

I.4 Analoga trifosfátu

Rozšířením struktury pyrofosfátu o další fosfátovou jednotku vzniká molekula v biologické praxi nazývaná triviálně trifosfát, z hlediska anorganické chemie se jedná o trifosforečnanový anion $\text{P}_4\text{O}_{10}^{5-}$. Trifosforečnany byly dříve používány jako změkčovadla vody, ale postupně se od nich upouští, protože jejich přítomnost v odpadních vodách vede k eutrofizaci (přemnožení sinic) ve vodním prostředí.^[14]

I.4.1 Role trifosfátu v organismu

Trifosfátový aniont je nedílnou součástí energetických pochodů v živých organismech, kde zastává roli makroergního prvku v molekule ATP, která je tvořena dusíkatou bází adenosinem, molekulou ribózy a trifosfátem (obr. 1.10). Po transportu molekuly na požadovanou lokaci v buňce dochází ke štěpení esterové vazby mezi poslední a předposlední fosfátovou jednotkou a uvolnění energie 30,5 kJ/mol.^[15]

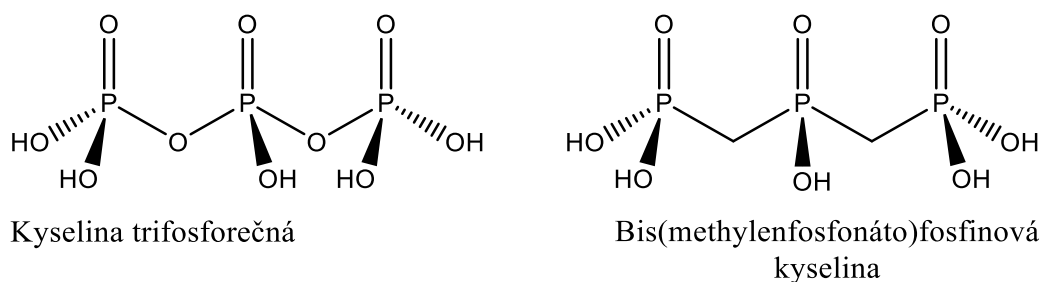


Obr 1.10: Adenosintrifosfát, tvořený nukleosidem a molekulou trifosfátu navázanou přes glykoesterovou vazbu

Trifosfát lze nalézt také ve spojení s ostatními nukleosidy (GTP, UTP, CTP). Tyto molekuly jsou kritické pro funkci enzymů zajišťujících transport chemických látek organismem (transferázy). Molekuly ATP, které se nacházejí mimo buňky, označované eATP (extracelulární ATP), fungují jako signální látka přenášející informace např. mezi buňkami nervového či imunitního systému.^[16] V neposlední řadě hraje trifosfát důležitou roli v procesech přepisování a kopírování DNA a RNA, kde ve formě nukleosid trifosfátů přistupují jednotlivé báze k rostoucímu řetězci, jak už bylo popsáno výše.

I.4.2 Organofosforový analog kyseliny trifosforečné

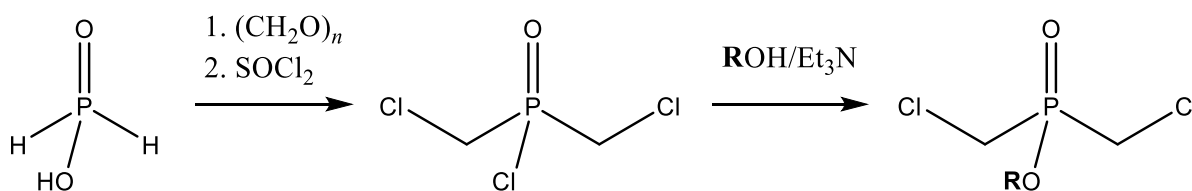
Obdobně jako byly geminální bis(fosfonáty) inspirovány molekulou pyrofosfátu, je kyselina bis(methylenfosfonáto)fosfinová odvozena od trifosfátu náhradou esterových vazeb methylenovými můstky (obr. 1.11). Tato kyselina je rozpustná ve vodě, ale nehydrolyzovatelná (podobně jako bis(fosfonáty)^[17]). Unikátním strukturním prvkem této sloučeniny je struktura PCPCP, která je známá z mnoha připravených polyfosfinů, ale zatím omezeně studovaná pro polyfosfinoxyd a molekuly obsahující geminální fosfonátové a fosfinátové skupiny.



Obr 1.11: Kyseliny obsahující tři atomy fosforu

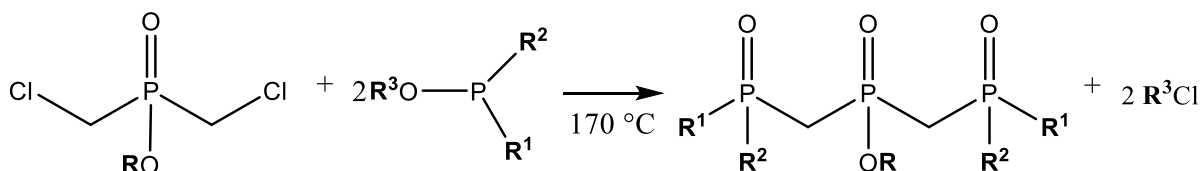
I.4.3 Syntéza látek se strukturou PCPCP

V 70. letech se přípravě látek tohoto typu věnoval L. Maier. Pro přípravu různých variant těchto látek používal sled reakcí využívající Michaelis-Arbusovovu reakci (obr. 1.13),^[18] která umožňuje přípravu těchto látek v množstvích jednotek až desítek gramů, není závislá na bezvodých rozpouštědlech a lze ji provádět pouze v ochranné atmosféře inertního plynu (není nutné ji provádět Schlenkovským způsobem). Michaelis-Arbusovově reakci předchází syntéza některého z esterů kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové (obr. 1.12):



Obr. 1.12: Syntéza chloridu pro Michaelis-Arbusovovu reakci

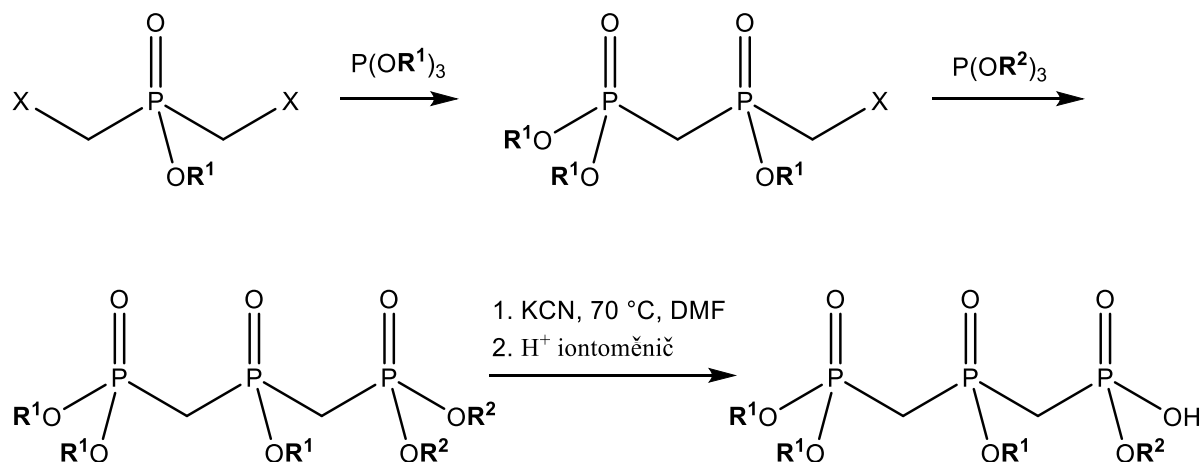
Estery kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové je možné připravit z kyseliny fosforové reakcí s paraformaldehydem, následnou výměnou hydroxylových skupin kyseliny bis(hydroxymethyl)fosfinové za skupiny chloridové pomocí SOCl_2 a následným převedením chloridu kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové na ester reakcí s požadovaným alkoholem v přítomnosti terciárního aminu (nejčastěji Et_3N).



Obr. 1.13: Michaelis-Arbusovova reakce, řetězce \mathbf{R}^1 a \mathbf{R}^2 mohou být alkyly či alkokidy

Michaelis-Arbusovova reakce spočívá ve vzniku vazby mezi atomy uhlíku a fosforu. K reakci dochází mezi elektronově deficitním uhlíkem v halogenidu s elektronovým párem na trojvazném atomu fosforu. Tato reakce je v Maierově práci prováděna většinou s nadbytkem činidla obsahujícího třívazný fosfor a jejím výsledkem jsou symetrické produkty. Asymetrické produkty byly připraveny také s cílem následné selektivní hydrolýzy jediné esterové skupiny a navazující reakce s látkou podobnou fruktóze s cílem připravit jednotku obsahující nehydrolyzovatelný analog trifosfátu, kterou by poté bylo možno navázat na jednu z dusíkatých bází tvořících nukleosidy a získat tak látky s širokým potenciálním využitím. Syntetický postup (obr. 1.13) vedoucí k těmto látkám spočívá v přípravě (methylenfosfonato)fosfinátu

obsahujícího halogenmethyllovou skupinu a jeho reakcí s fosfitem obsahujícím odlišné řetězce na atomech kyslíku^[19]:

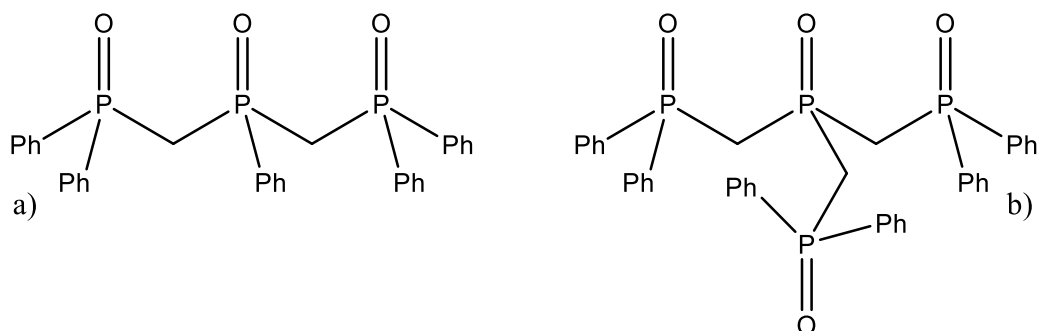


Obr. 1.13: Syntetický postup vedoucí k asymetrickým produktům a selektivní monodeprotonaci

Takto připravený monodeprotonizovaný ester reaguje s benzylovými skupinami chráněným nukleosidem. Následná protonizace produktu vede k analogům molekul jako je UTP s nehydrolyzovatelnou bis(methylenfosfonáto)fosfinátovou komponentou.

Kromě kyseliny bis(methylenfosfonáto)fosfinové obsahující pět hydroxylových skupin je možné připravit i látky obsahující atomy fosforu v nižších formálních oxidačních stavech. Fosfiny obsahující strukturní motiv PCPCP jsou známy jako polydentátní ligandy komplexující měkké kovy. Tyto komplexy jsou často používány jako katalyzátory různých organických reakcí, ve kterých dochází k cyklu oxidativní adice – reduktivní eliminace.^[20]

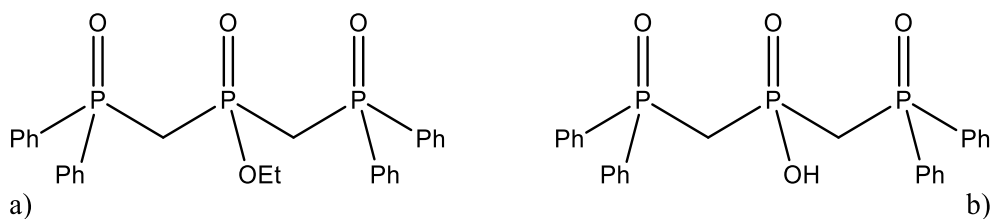
Fosfinoxydy už patří mezi ligandy tvrdé. Fosfinoxidům se strukturním prvkem PCPCP byla a stále je věnována pozornost jako potenciálním ligandům pro extrakci aktinoidů. Komplexační vlastnosti geminálních difosfinoxydů jsou známy už řadu let a byly extenzivně studovány. Logické rozšíření struktury o další methylenfosfinoxydovou jednotku mělo očekávatelný efekt a vedlo k syntéze ligandů (obr. 1.14) vhodných pro extrakci plutonia a americia z okyselených vodných roztoků do organických rozpouštědel.^[21]



Obr. 1.14: Ligandy pro extrakci Ac^{3+} kationtů z vodného roztoku organickým rozpouštědlem
a) bis(methylen(difenyfosfinoxid))fenyl fosfinoxid b) tris(methylen(fosfinoxid)) fosfinoxid

Tyto látky byly použity také jako funkční skupiny nanesené pomocí polymeru na silikagel a testovány jako potencionální adsorbent pro oddělování kationtů uranových z roztoku od produktů štěpení, což je proces využívaný při recyklaci vyhořelého paliva z jaderných reaktorů. Absorpce na silikagel je z environmentálního hlediska lepší než dělení kationtů na rozhraní nemísitelných tekutin, protože odpadá nutnost používat s vodou nemísitelné, většinou chlorované rozpouštědlo. I v tomto případě se polyfosfinoxidy ukázaly jako nadějně specifické ligandy pro budoucí použití.^[22]

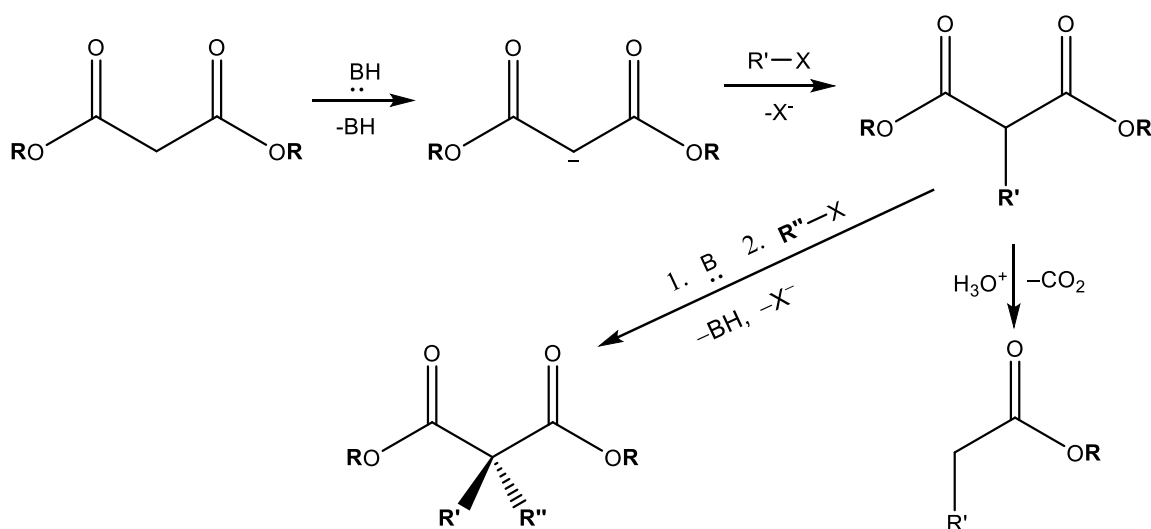
Dalším teoretickým oxidačním stupněm těchto molekul je látka obsahující ve středu fosfinovou kyselinu nebo fosfinát. V literatuře již byl popsán ethylester kyseliny bis(difenyfosfinoxidmethylen)fosfinové (obr 1.15), který tvoří stabilní komplex s měďnatými kationty, jehož krystalová struktura je známa.^[23] Komplexy s dalšími kovy však nejsou příliš stabilní a krystalové struktury získány nebyly. Volná kyselina vytváří komplexy snadněji a ty jsou stabilnější než jejich esterové protějšky. Přítomnost čtyř fenylových skupin v řetězci způsobuje nerozpustnost těchto sloučenin ve vodě a jako ligandy pro potencionální použití v biologických studiích nejsou tyto látky vhodné. Redukce látek tohoto typu by mohly vést k polyfosfinům obsahujícím objemné skupiny na krajích řetězce a možnému použití jako ligandu pro katalýzu měkkými kovy.^[24]



Obr. 1.15: Sloučeniny se středovým fosfinátem: a) Ethylester kyseliny bis(methylen-difenylfosfinoxid)fosfinové b) Kyselina bis(methylen-difenylfosfinoxid)fosfinová

I.4.4 Funkcionalizace methylenových můstků geminálních bis(fosfonátů)

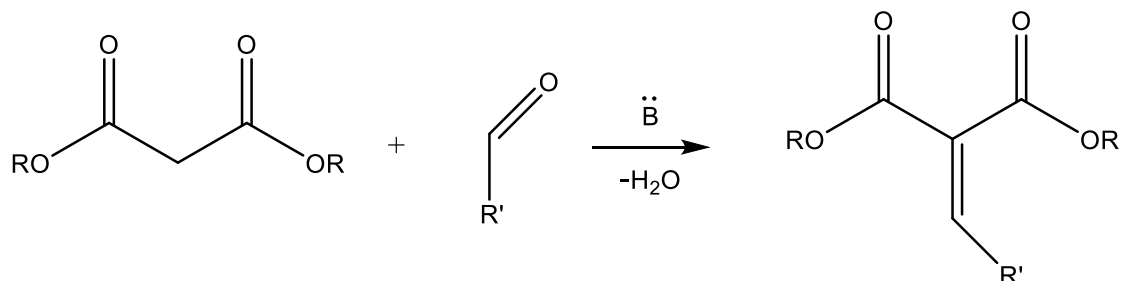
Malonesterová syntéza je známá reakce, jejímž základním předpokladem je acidita vodíkových atomů v alfa pozici kyseliny malonové. Tato reakce (obr 1.16) je snadnou cestou k vytváření nových vazeb uhlík-uhlík. Tuto reakci může následovat dekarboxylace, která vede k prodloužení původního alkylhalogenidu o dva atomy uhlíku. Další možností je zopakování alkylation pomocí báze a alkylhalogenidu vedoucí k substituci druhého atomu vodíku na methylenovém můstku.^[25] I v případě dialkylace je možné provést následnou dekarboxylaci. Tento postup se používá pro přípravu cyklických sloučenin obsahujících karboxylovou skupinu v Perkinově acyklické syntéze.



Obr 1.16: Příklady malonesterové syntézy

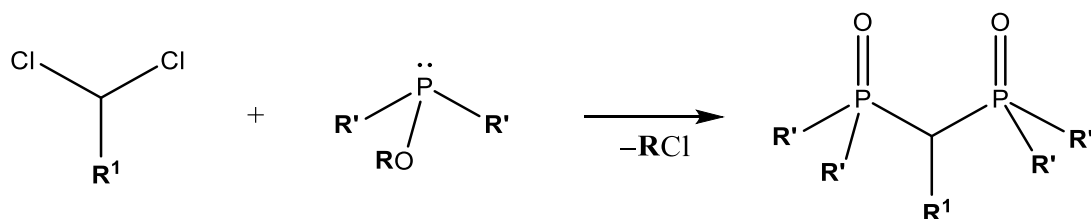
Další podobnou reakcí je Knoevenagelova kondenzace. Stejně jako v případě malonesterové syntézy k ní dochází na alfa atomu uhlíku mezi dvěma skupinami snižujícími elektronovou hustotu (například diester kyseliny malonové), ale jako reaktant do reakce vstupuje aldehyd (obr. 1.17). V této reakci se také používá báze jako činidlo způsobující vznik karbaniontu. Přítomnost aldehydu však omezuje výběr použité báze, protože příliš silné báze mohou vést k aldolové kondenzaci aldehydu se sebou samým. Zatímco v malonesterové

syntéze je možné použít např. hydrid sodný, v Knoevenagelově kondenzaci se většinou používají organické dusíkaté báze, jako je např. pyridin. Tato reakce vede ke vzniku dvojné vazby a stejně jako u malonesterové syntézy je možná následná dekarboxylace.^[26]



Obr. 1.17: Knoevenagelova syntéza, vedoucí ke dvojné vazbě na methylenovém můstku

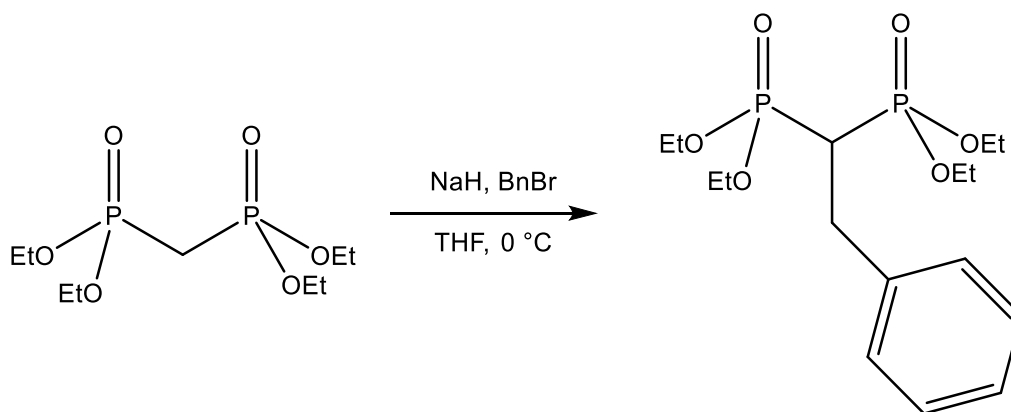
Geminální bis(fosfonáty) obsahující specifické postranní řetězce byly v minulosti často připravovány postupným připojováním fosfonátových skupin k existujícímu řetězci (obr 1.18). Tento postup je založen na Michaelis-Arbuzovově reakci dihalogenidu s dvěma ekvivalenty trialkylfosfinitu^[27]. Tento postup je analogický jednomu z prvních objevených postupů přípravy geminálních bis(fosfonátů) z diiodomethanu.^[28] Připravit geminální bis(fosfonáty) obsahující dva postranní řetězce se však tímto postupem nepodařilo. Důvodem může být například sterické bránění, které u terminálního dihalogenidovaného atomu uhlíku přítomno není.



Obr. 1.18: Syntéza geminálních bis(fosfonátů) s jedním postranním řetězcem

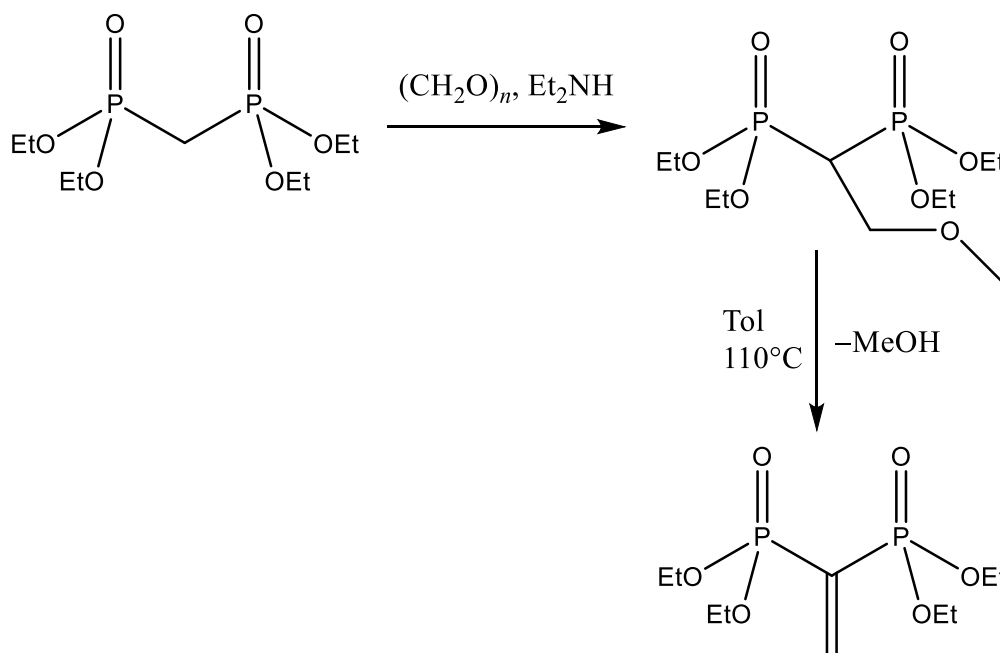
V molekulách obsahujících motiv PCP, jejichž atomy fosforu nesou dostatečné množství atomů kyslíku, (např. v případě geminálních bis(fosfonátů)) dochází ke snižování elektronové hustoty na atomech uhlíku methylenových můstků podobně, jako k tomu dochází u esterů kyseliny malonové. Díky tomu je možné pomocí báze zahájit deprotonaci těchto můstků a pomocí halogenderivátů je funkcionalizovat dále. Tato reakce (obr 1.19) byla popsána pro geminální bis(fosfonáty) v reakčním postupu, který dále vedl k přípravě tris(fosfonátů)*^[29].

* Látky obsahující atom uhlíku, na kterém jsou navázány tři fosfonátové skupiny



Obr. 1.19: Funkcionalizace methylenového můstku působením báze na geminální bis(fosfonát)

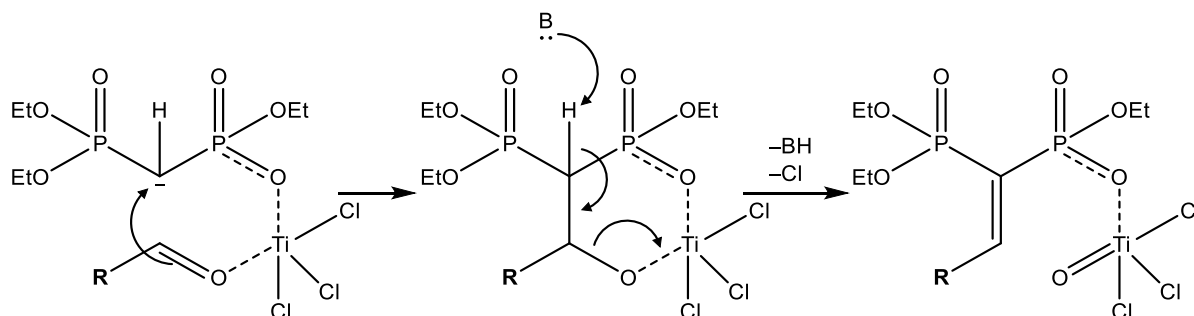
Jelikož bylo prokázáno, že reaktivita methylenového můstku v geminálních bis(fosfonátech) odpovídá reaktivitě malonesterů, byly provedeny pokusy o napodobení Knoevenagelovi syntézy s geminálním bis(fosfonátem) nahrazujícím ester malonové kyseliny. Během reakce bis(fosfonátu) s aldehydy v methanolu za přítomnosti báze dochází v prvním kroku reakce k vzniku éterů (obr. 1.20):



Obr. 1.20: Knoevenagelova kondenzace provedená na geminálním bis(fosfonátu)

Docílit stejného výsledku jako v Knoevenagelově kondenzaci je možné následnou eliminací metanolu ze vniklého éteru jeho zahřátím v přítomnosti katalytického množství *p*-toluensulfonové kyseliny.^[30]

Tuto reakci je však možné provést i v jednom kroku, a to v přítomnosti chloridu titaničitého (obr. 1.21). Podle předpokládaného reakčního mechanismu usnadňuje koordinovaný titaničitý kation vznik dvojné vazby kompletní eliminací atomu kyslíku z molekuly přístupujícího aldehydu:



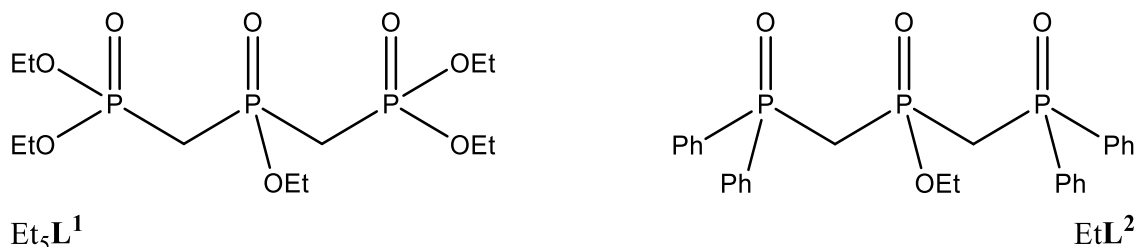
Obr. 1.21: Vznik dvojné vazby v geminálních bis(fosfonátech) v přítomnosti chloridu titaničitého

Tento způsob přípravy umožňuje přípravu velkého množství látek, postranní řetězec **R** reaktivitu neomezuje a byly takto připraveny geminální bis(fosfonáty) obsahující jak alifatické, tak aromatické řetězce s několika různými funkčními skupinami. Takto připravené geminální bis(fosfonáty) jsou dostatečně stabilní na to, aby je bylo možné čistit vakuovou destilací. Dále je možné hydrogenovat dvojnou vazbu na methylenovém atomu uhlíku pomocí paladia na aktivním uhlí za vzniku jednoduché vazby.^[31]

Podobnou reaktivitu lze předpokládat i pro struktury obsahující strukturní motiv PCPCP. Snižování elektronové hustoty na methylenových můstcích však bude s největší pravděpodobností nižší kvůli sdílené a zároveň méně elektronegativní fosfinátové skupině ve středu molekuly.

I.5 Cíl práce

Cílem této práce bylo studium reaktivity methylenových můstků ve strukturách esterů kyselin bis(methylenfosfonáto)fosfinové Et_5L^1 a bis((difenylfosfinoxyd)methylen)fosfinové EtL^2 (obr. 1.22). Tyto látky byly připraveny už v minulosti, reaktivita methylenových můstků vzhledem k cyklizaci ještě studována nebyla.



Obr 1.22: Struktury výchozích látek pro cyklizace

Druhým tématem této práce bylo studium acidobazických a komplexačních vlastností hydrolyzované H_5L^1 pomocí potenciometrických titrací. Kromě komplexace dvoumocných přechodných kovů a kovů I. a II. skupiny bylo také sledováno chování a interakce H_5L^1 s ethylendiaminem.

II. Experimentální část

II.1.1 Chemikálie

Veškeré použité chemikálie a rozpouštědla byla zakoupena z komerčních zdrojů (Sigma-Aldrich, Lachema), a pokud není přímo u experimentu uvedeno jinak, nebyla dále čištěna.

II.2 Experimentální metody

II.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna s mobilní fází EtOH:EtOAc 1:5. Jako stacionární fáze sloužily hliníkové destičky pokryté silikagelem obsahující fluorescenční látku (F₂₅₄, Merck). Detekce stop byla prováděna pomocí UV záření a barvením v parách I₂.

II.2.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektra NMR (¹H, ³¹P a ³¹P{¹H}) byla měřena pomocí dvou zařízení. Jednalo se o Varian VNMRs 300 a Ascend 400 (Bruker). Vzorky byly měřeny v 5mm kyvetách. Jako vnitřní standard pro ¹H NMR byl používán TMS ($\delta = 0,00$ ppm) v případě měření v CDCl₃ (99,8 % D, Armar Chemicals) a *t*-BuOH ($\delta = 1,25$ ppm) pro vzorky měřené v D₂O (99,8 % D, Chemotrade). Pro měření ³¹P a ³¹P{¹H} NMR byl používán jako externí standard 85% roztok H₃PO₄ nezávisle na použitém rozpouštědle. Tento roztok byl do vzorků ponořován v inertní kyvetě. Všechna měření byla prováděna při teplotě 25 °C.

II.2.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Pro měření hmotnostních spekter byl používán stroj Bruker Esquire 300. Vzorky byly ionizovány ESI, analýza *m/z* vniklých nabitých částic byla prováděna pomocí iontové pasti. Byla měřena spektra jak záporně, tak kladně nabitých částic. Do vzorků obsahujících cyklické formy molekul **L**¹ a **L**² byla před finálním ředěním přidávána kapka 0,1 M roztoku octanu sodného. V textu jsou diskutované pouze takové záznamy, které odpovídají zkoumaným molekulám a reakčním procesům a zároveň dosahují vyšší intenzity než např. přirozené pozadí používaného nástroje.

II.2.4 Rentgenová difrakce na monokrystalu

Sktruktura látek, u kterých byl získán vhodný monokrystal, byla určena rentgenostrukturní analýzou na přístroji Bruker D8 VENTURE Kappa Duo PHOTON100 při teplotě 150 K (Cystostream Cooler, Oxford Cryosystem). Jako zdroj záření byla použita emisní linie K _{α} z molybdenové elektrody. Záření procházelo grafitovým monochromátorem o vlnové

délce 0,71073 Å. Data byla analyzována programem SAINT V8.27B (Bruker AXS Inc, 2012), korekce na efekt absorpce byla provedena metodou opakovaného skenování SADABS. Struktury byly řešeny přímými metodami pomocí programu SHELXS97^[32] a parametry struktur byly upřesněny metodou nejmenších čtverců (SHELXL2014^[33]). Pozice všech atomů kromě atomů vodíku byly upřesněny anizotropicky, pozice atomů vodíku byly vypočteny z mapy elektronové hustoty. Ty vázané na atomy uhlíku byly zařazovány v teoreticky vypočtených polohách (term. parametry $U_{eq}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$), pozice atomů vodíku náležejících heteroatomům byly upřesněny kompletně.

II.2.5 *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

HPLC byla prováděna jak v analytické, tak v preparativní formě a záznamy z analytického dělení látek sloužily jako návod pro preparativní postupy. Analytický HPLC přístroj se skládal z degaseru DG3104, mobilní frakce byla směřována a tlakována gradientovou pumpou Beta, za kterou byla zapojena směšovací komora Knauer (oboje ECOM) vybavená vstřikovací jednotkou Sample Injector D (také ECOM). Vlastní dělení probíhalo na silikagelové koloně C8 ReproSil Gold (rozměr 150 × 4,6 mm, průměr částic 5 µm, zrnitost 120 Å). Složky mobilní fáze: acetonitril (Rotisolv, HPLC Gradient grade), deionizovaná voda (přístroj MILIPORE), 0,1 % TFA v deionizované vodě. Detekce byla prováděna UV-Vis detektorem Topaz (ECOM) a data byla sbírána pomocí programu Clarity.

Preparativní HPLC bylo prováděno se stejnými mobilními fázemi jako HPLC analytické. Přístroj sám se skládal z gradientové pumpy LCP 4100, vstřikovacího ventilu Typ B a detektoru LCD 2083 vybaveného jednou lampou nastavenou na 254 nm (vše ECOM). Vzorky byly děleny na koloně Luna® 10µ C18(2) 100 Å(250×21.2 mm), data byla sbírána pomocí programu Clarity, zachyt frakcí byl prováděn manuálně podle vznikajícího chromatogramu.

II.2.6 *FLASH chromatografie*

Sloupcová chromatografie za zvýšeného tlaku byla prováděna na sestavě zařízení složené z kontrolní jednotky C-620, kolektoru frakcí C-660, dvou pump C-605 a UV spektrometru C-640 (vše Büchi), vybaveného čtyřmi lampami nastavenými na vlnové délky 210 nm, 225 nm, 235 nm a 254 nm. Záznam vlnové délky 254 nm sloužil jako hlavní kritérium pro oddělování frakcí. K rozdělení frakcí docházelo na reverzní fázi na koloně C18 (Sepacore 120g, Büchi) pomocí postupné změny složení mobilní fáze acetonitril-voda s konstantním obsahem 0,2 % TFA (acetonitril: Rotisolv, deionizovaná voda).

II.2.7 *Kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie (LC-MS)*

Analýza pomocí kapalinové chromatografie následované hmotnostní spektrometrií byla provedena na přístroji Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril-voda na reverzní fázi na koloně Poroshell 120 EC-C18, 2,7 μm , 4,6 mm \times 50 mm. Získaný set MS měření byl vyhodnocen pomocí programu Openchrom^[34]

II.2.8 *Potenciometrie*

Zásobní roztoky pro titrace byly připraveny a jejich koncentrace stanoveny Mgr. Z. Böhmovou následujícím způsobem:

Roztoky chloridů kovů byly připraveny rozpuštěním odpovídajících solí, které byly předem rekrystalizovány, v deionizované vodě. Jejich koncentrace kolem 0,05 M byla určena s přesností na 4 platné číslice pomocí chelatometrie.

Roztok ethylendiaminu byl připraven z čerstvě predestilovaného ethylendiaminu rozpuštěním v deionizované vodě. Jeho koncentrace byla zjištěna pomocí potenciometrické titrace. Disociační konstanty spočítané při upřesňování koncentrace pomocí programu OPIUM se shodují s konstantami nalezenými v literatuře.^[35]

Roztok NMe_4OH byl připraven na ionexu Dowex 1 (promytém hydroxidem do negativní reakce na chloridové ionty a poté vodou do neutrality) z rekrystalizovaného chloridu tetramethylamonia. Eluce byla prováděna vodou zbavenou CO_2 do trojhrdlé baňky, skrz kterou po dobu eluce proudil argon. Roztok byl následně vyčištěn přidáním aktivního uhlí a následnou filtrací. Přesná koncentrace roztoku byla zjištěna odečtením inflexních bodů titračních křivek vniklých při titraci různých roztoků hydrogentereftalátu draselného, připravených z rekrystalizovaných a sušených navážek.

Roztok HCl obsahující NMe_4Cl byl připraven rozpuštěním chloridu tetramethylamonnia v deionizované vodě a přidáním 37 % HCl . Přesná koncentrace byla zjištěna titrací zásobním roztokem NMe_4OH .

Potenciometrické titrace byly prováděny pomocí pH-metru PHM 240, MeterLab, automatické byrety ABU 900 ovládané pomocí počítače a kombinované elektrody GK 2401B, Radiometer. Titrace byly prováděny v deionizované vodě (MILIPORE) za teploty $25,0 \pm 0,2$ °C udržované dvouplášťovými nádobkami připojenými k termostatu. Titrace byly prováděny v proudu argonu, který byl probubláván cca 0,1 M roztokem chloridu tetramethylamonného. Počáteční dávkování vstupních složek systému (ligand, kov, kyselina chlorovodíková s NMe_4Cl) bylo prováděno byretami s mikrometrickým šroubem (přesnost $\pm 0,002$ ml), jejichž objemy byly upřesněny pomocí titrace známých látek. Před každou titrací

i kalibraci byla zcela vypláchnuta dvakrát destilovanou vodou, dvakrát acetonem a vysušena. Stejně tak bylo před každým měřením zkontrolováno vedení hydroxidu tetramethylamonného systémem automatické byrety, především na přítomnost bublin, které byly případně ze systému vytlačeny opakovaným napouštěním a vypouštěním. Po zavedení elektrody do měřicí cely byla automatická byreta resetována na známý krok vypuštěním jedné kapky ze systému, která byla před zavedením hadičky do cely odstraněna ve výšce, která odpovídala pozici hadičky v cele.

Během titrací byla sledována aktivita H^+ iontů kombinovanou argentchloridovou elektrodou jako elektrochemický potenciál s přesností 0,1 mV. Koncentrace vodíkových kationtů byla přepočítávána dle rovnice:

$$E = E_0' + S \log[H^+] + j_a[H^+] + j_b \left(\frac{K_w}{[H^+]} \right).$$

Jedná se o Nernstovu rovnici obsahující následující parametry: potenciál E_0' zahrnuje standardní elektrodový potenciál použitého nástroje, ale také příspěvek iontů k potenciálu kapalinového rozhraní. Tento potenciál byl udržován na konstantní hladině během titrace přítomností NMe_4Cl v koncentraci řádově přesahující přidávaná množství zásady i kyseliny. Nernstova směrnice S má teoretickou hodnotu 0,0591 pro teplotu 25 °C, ale je významně ovlivněna iontovým součinem vody K_w , který je kromě teploty závislý i na iontové síle roztoku. Protože iontová síla roztoku je udržována na konstantní hladině, je možné pracovat i s iontovým součinem jako s konstantou o hodnotě $K_w = 13,81$ a směrnicí S upřesňovat výpočtem. Parametry j_a a j_b popisují odchylku jinak lineární závislosti potenciálu elektrody na aktivitě H^+ iontů v silně kyselé a zásadité oblasti*.

Reprodukovatelnost titrace byla zajištěna prováděním každé titrace třikrát, čímž byl omezen vliv lidské chyby při dávkování vstupních roztoků. Srovnatelnost jednotlivých titrací byla zajištěna externími kalibracemi: před každým setem tří titrací byla prováděna kalibrační titrace známého množství zásobního roztoku HCl roztokem NMe_4OH dokud změna parametrů E_0' a S nepřesahovala 0,1 %. Stejně kalibrační titrace byly prováděny mezi každými dvěma měřeními a jedna tato kalibrační titrace byla prováděna po třetí titraci. I u těchto kalibračních titrací nesmělo dojít ke změně parametrů elektrody. Parametry Nernstovy rovnice byly poté použity pro vyhodnocení hodnot změn elektrochemického potenciálu získaných při titraci zkoumané látky. Titrace byly prováděny v rozmezí pH 1,8–12 nebo do vyloučení sraženiny.

* $[H^+]$ označuje koncentraci vodíkových kationtů, poměr $K_w/[H^+]$ odpovídá koncentraci OH^- aniontů.

II.2.9 Vyhodnocování potenciometrických měření

Vyhodnocení dat z potenciometrických titrací probíhalo pomocí programu OPIUM^[36]. Tento program umožňuje hledání závislosti složení roztoku v rovnovážném stavu na kalibrační funkci a na chemických parametrech dle definice funkce $y = f(\mathfrak{G}, c, n, V, c', q, \beta; V')$. Tato funkce je programem separována na dvě části: první z nich je část kalibrační definovaná jako $y = (\mathfrak{G}, c)$, kde \mathfrak{G} je kalibrační funkce. Zbylé nezávislé proměnné popisují složení roztoku: $q = \{q_{ji}\}$ je dvourozměrnou maticí stechiometrických koeficientů, ve které jsou definovány jednotlivé komplexní molekuly přítomné v systému. Tyto molekuly jsou definovány svým složením, zdánlivou konstantou stability β , koncentrací c' , látkovým množstvím n a objemy V (celkový objem titrovaného roztoku) a V' (objem přidaného roztoku NMe₄OH). Program obsahuje kalibrační funkci popisující chování kombinované elektrody a správnost spočtených parametrů je vyhodnocována metodou nejmenších čtverců. Vstupní data pro program tvořilo vždy šest sérií dat z titrací. Každá ze třech titrací byla do systému zanesena dvakrát, jednou opatřena parametry elektrody z titrační kalibrace předcházející titraci a jednou s parametry získanými po titraci.

II.2.10 NMR titrace

NMR titrace byly měřeny na stroji Varian VNMRS 300. Pro titrace byl používán zásobní roztok kyseliny o objemu 5 ml a koncentraci zkoumané kyseliny cca 0,1 M. Jeho pH bylo regulováno pomocí roztoku HCl (v různých koncentracích) a cca 0,1 M roztoku NMe₄OH a určováno pomocí předem zkalibrovaného pH metru Jenway 3505 s elektrodou H-PH 1 (Hamilton). Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda. Měření probíhalo při teplotě 25 °C a s insertem obsahujícím 85 % H₃PO₄ ($\delta = 0,0$ ppm). Vzhledem k provádění měření v lehké vodě byly sledovány pouze změny posunu signálu ${}^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR.

II.3 Syntéza

II.3.1 Pentatehylester kyseliny bis(methylenfosfonáto)fosfinové Et₅L^[18]

Do trojhrdlé baňky vysušené zahříváním horkovzdušnou pistolí v proudu argonu bylo injekční stříkačkou skrz septum přikapáno 35 g (0,21 mol, 4 ekv.) triethylfosfitu a 10 g (0,052 mol) ethylesteru kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové^[17]. Směs byla zahřívána na teplotu 180 °C pod zpětným chladičem opatřeným bublačkou v proudu argonu po dobu 16 hod. Po ukončení zahřívání a vychladnutí směsi byl produkt vakuově destilován. Zachycena byla frakce b.v. 220 °C při 86 Pa obsahující Et₅L¹ v čistotě 99 % dle NMR a množství 14.7 g (72 % teor.)

Charakterizace:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.35 (m, $\text{OP}-(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, 12H); 1.36 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.06$ Hz, $\text{OP}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, 3H); 2.79 (dd, $^2J_{\text{HP}} = 20.4$; 18.6 Hz, $\text{P}-\text{CH}_2-\text{P}$, 4H); 4.19 (m, OCH_2CH_3 , 10H)
 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR(121 MHz, CDCl_3) δ : 19.58 (d, $^3J_{\text{PP}} = 3.3$ Hz, $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$, 2P); 37.76 (t, $^3J_{\text{PP}} = 3.3$ Hz, $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)$, 1P)

II.3.2 *Kyselina bis(methylenfosfonáto)fosfinová H₅L¹*^[18]

3,0 g (7,6 mmol) Et_5L^1 bylo rozpouštěno ve 20 ml konc. HCl v baňce opatřené zpětným chladičem a magnetickým míchadlem. Směs byla refluxována po dobu 6 h. Po vychladnutí byla směs zbavena vody na RVO. Poté bylo do směsi přidáno cca 20 ml EtOH, který byl opět odpařen na RVO. Tento postup byl opakován dvakrát. Vzniklý olej byl rozpuštěn v cca 20 ml MeOH a bylo přidáno 3,7 g (37,4 mmol, 5 ekv.) cyklohexylaminu. Směs byla zahřívána těsně pod bod varu a do směsi byl přidáván aceton, dokud nedošlo k vytvoření zákalu, který se po zahřátí nerozpouštěl. Sraženina vzniklá ochlazením roztoku byla odfiltrována a stejným postupem několikrát rekrystalizována. Tato sraženina byla pomocí integrace $^1\text{H-NMR}$ spektra identifikována jako cyklohexylamonná sůl kyseliny bis(methylenfosfonato)fosfinové, která dle $^{31}\text{P-NMR}$ neobsahovala žádné příměsi obsahující fosfor. Sůl byla převedena zpět do formy volné kyseliny pomocí silného katexu (Dowex 50m 200/400 mesh). Získáno bylo 1,5 g H_5L^1 (82 % teorie) v různých stupních čistoty (dle úspěšnosti rekrystalizace, postup byl prováděn několikrát po menších dávkách). Pro potenciometrické titrace byla použita frakce, která dosahovala čistoty 100 % dle $^{31}\text{P-NMR}$.

Charakterizace:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ : 2.45 (dd, $^2J_{\text{HP}} = 19,99$; 17,94 Hz, $\text{P}-\text{CH}_2-\text{P}$, 4H)
 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR(121 MHz, D_2O) δ : 16.34k (d, $^3J_{\text{PP}} = 10.14$ Hz, $\text{OP}(\text{OH})_2$, 2P); 37.76 (t, $^3J_{\text{PP}} = 10.17$ Hz, $\text{OP}(\text{OH})$, 1P)

II.3.3 *Dianilinium bis(fosfonáto)fosfinát, monohydrát*

2,0 (7,8 mmol) g H_5L^1 bylo rozpuštěno za horka v cca 20 ml MeOH v kulaté baňce. Do baňky bylo přidáno 4,4 g (47 mmol, 6,0 ekv) anilinu. Rozpouštědlo poté bylo odpařeno na RVO. Vzniklá sraženina byla rozpuštěna za horka v minimu MeOH. Za stálého míchání a zahřívání směsi byl přikapáván aceton. Sraženina vzniklá v místě kontaktu acetonu se směsí byla vždy rozpuštěna před dalším přidavkem. Přidávání acetonu bylo ukončeno ve chvíli, kdy roztok zůstal po přidavku lehce zakalený vzniklou sraženinou. 2 ml tohoto roztoku bylo pomocí injekční stříkačky s filtrem přeneseno do vialky uzavřené septem. Krystalizace probíhala

postupným ochlazováním roztoku na RT a pomalým odpařováním matečného roztoku skrz septum probodnuté jehlou. Vzhledem k neznámému objemu původního roztoku v baňce nelze určit výtěžek krystalizace. Látka byla identifikována pomocí rentgenové strukturní analýzy monokrystalu, viz diskuze.

II.3.4 Ethylester kyseliny bis((difenylfosfinoxid)methylen)fosfinové EtL²^[18]

V předem vysušené trojhrdlé baňce opatřené zpětným chladičem s bublačkou, septem, přívodem argonu a magnetickým míchadlem bylo při teplotě 160 °C přivedeno k refluxu 6,6 g (0,029 mol, 1,1 ekv) ethyl difenylfosfinitu. Do refluxující směsi bylo přidáno skrz septum injekční stříkačkou 5,0 g (0,026 mol) ethylesteru kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové. Směs byla zahřívána dalších 6 hod. Po uplynutí této doby bylo do směsi přidáno dalších 6,6 g ethyl difenylfosfinitu (celkem 2,2 ekv). Směs byla míchána dalších 8 hodin. Po ukončení zahřívání a ochladnutí na RT byl vniklý velmi tuhý gel čištěn po částech (cca 1,5 g) sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází EtOAc:EtOH 5:1. Po odpaření spojených frakcí zbyl v baňce bílý prášek, který byl zbaven zbytkových rozpouštědel v exsikátoru. Celkem bylo získáno 10,5 g (78 % teor.) EtL².

Charakterizace:

¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 0.8 (t, ³J_{HH} = 6.9 Hz, OP-(OCH₂CH₃), 3H); 3.39 (m, P-CH₂-P, 4H); 3,75 (m, OCH₂CH₃, 2H); 7.65 (m, -C₆H₅, 20H)
³¹P{¹H}-NMR(121 MHz, CDCl₃) δ: 25.24 (d, ³J_{PP} = 11.09 Hz, OPPh₂, 2P); 38.75 (t, ³J_{PP} = 11.09 Hz, OP(OC₂H₅), 1P)

II.3.5 Kyselina bis((difenylfosfinoxid)methylen)fosfinová HL²

1 g (1,9 mmol) EtL² bylo rozpuštěno v cca 20 ml konc. HCl v kulaté baňce opatřené zpětným chladičem a magnetickým míchadlem. Směs byla přivedena k teplotě refluxu a po dobu 12 hodin byla za stálého míchání zahřívána. Obsah baňky byl poté odpařen na RVO, několikrát rozpuštěn v EtOH a odpařen. Na závěr byl gel nažloutlé barvy rozpuštěn za horka v MeOH a po vychladnutí byla sraženina odfiltrována. Bylo získáno 0,64 g (67 % teor.) bílého prášku HL², který byl podroben charakterizaci pomocí NMR.

Krystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu byl připraven rozpuštěním 0,1 g (0,2 mmol) HL² a 0,13 g (5 ekv) bezvodého NiCl₂ v MeOH za horka. Bezbarvé krystaly vzniklé volným ochlazováním byly studovány rentgenovou strukturní analýzou.

Charakterizace:

¹H-NMR(400 MHz, MeOD-d₃) δ: 3.39 (dd, ²J_{HP} = 18,16; 12,91, P-CH₂-P, 4H); 7.65 (m, -C₆H₅, 20H)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR(162 MHz, MeOD- d_3) δ : 28.73 (d,
 $^3J_{\text{PP}} = 12.54$ Hz, OPh_2 , 2P); 33.20 (t, $^3J_{\text{PP}} = 12.54$ Hz,
 $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)$, 1P)

II.3.6 α,α' -dibrom-*o*-xylene

4,0 g (0,038 mol) *o*-xyleny a 14 g (0,079 mol) NBS* bylo rozpuštěno ve dvouhrdlé kulaté baňce opatřené magnetickým míchadlem ve 40 ml chloroformu. Hlavní hrdlo bylo opatřeno sestupným chladičem. Bočním hrdlem byl do soustavy hnán po dobu několika minut argon. Chladič byl opatřen balónkem napuštěným argonem a přívod argonu v bočním hrdle baňky byl vyměněn za septum. Během zahřívání baňky v olejové lázni bylo do směsi přikapáno 0,3 g (0,43 mmol) 31% MEKP† v oleji. Směs byla refluxována po dobu 10 h. Po ukončení zahřívání a vychladnutí na pokojovou teplotu bylo do směsi přidáno 40 ml dichlormethanu. Organická fáze byla třikrát promyta 50 ml vody a sušena přes noc bezvodým uhličitánem sodným. Po filtraci byla organická fáze odpařena na RVO a sraženina byla několikrát rekrystalována ze směsi hexan:ethanol 20:1. Byly získány lehce nahnědlé krystaly v množství 7.12 g (71 % teor.)

Charakterizace: ^1H -NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 4.7 (s, $-\text{CH}_2-\text{Br}$, 4H),
7.3–7.4 (4H, m, Ar)

II.3.7 Cyklizace Et_5L^1

Do 2ml vialky opatřené septem a magnetickým míchadlem byl odvážen hydrid sodný (množství viz diskuze). Vialka byla profouknuta argonem, opatřena balónkem s argonem a ponořena do lázně suchý led-ethanol (přibližně -70 °C). Poté bylo injekční stříkačkou do vialky přidáno 100 mg $\text{Et}_5\text{L}^{1[17]}$ rozpuštěné v jednom mililitru suchého THF. Po 20 minutách bylo do směsi přidáno cyklizační činidlo (viz diskuze) rozpuštěné v 1 ml suchého THF. Směs byla míchána 10–12 hod, bez obnovy chlazení (dosáhla tedy pokojové teploty). Směs byla filtrována, pevná složka byla několikrát promyta dalším přídatkem THF a filtrát byl odpařen na RVO. Vniklý olej byl dále analyzován.

II.3.8 Cyklizace EtL^2

Do 2ml vialky opatřené septem a magnetickým míchadlem byl odvážen hydrid sodný (množství viz diskuze). Vialka byla profouknuta argonem, opatřena balónkem s argonem a ponořena do ledové lázně (přibližně 0 °C). Poté bylo injekční stříkačkou do vialky přidáno 100 mg EtL^2 rozpuštěné v jednom mililitru suchého DMF. Po 20 minutách bylo do směsi

* N-bromsukcinimid

† Methyl ethyl keton peroxid, iniciátor radikálové reakce

přikapáno cyklizační činidlo (viz diskuze) rozpuštěné v 1 ml suchého DMF. Směs byla míchána 10–12 hod, bez obnovy chlazení (dosáhla tedy pokojové teploty). Směs byla filtrována, pevná složka byla několikrát promyta dalším přídatkem DMF a filtrát byl odpařen na RVO. Vniklý olej byl dále analyzován.

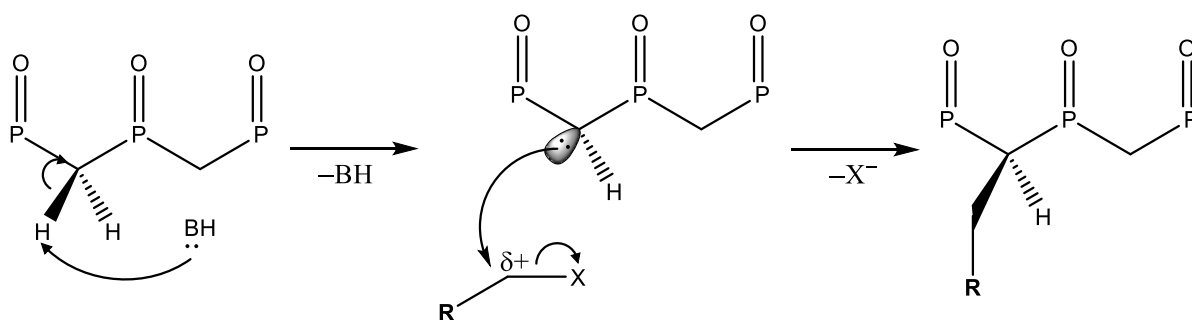
II.3.9 Cyklizace Et_5L^1 aldehydem s $TiCl_4$

Do 2 ml vialky bylo umístěno magnetické míchadlo a 0,021 g NaH (0,53 mmol 4,2 ekv.). Vialka byla profouknuta argonem, opatřena argonovým balonkem a umístěna do ledové lázně (cca 0 °C). Poté bylo do vialky injekční stříkačkou za stálého míchání a chlazení vpraveno 0,047 g (0,16 mmol, ekv.) $TiCl_4$ v 0,5 ml suchého CCl_4 a 0,05 g (0,13 mmol) Et_5L^1 v 0,5 ml suchého CCl_4 . Po 30 minutách míchání byl do ledové lázně doplněn led a injekční stříkačkou bylo do vialky vpraveno 0,014 g (1,1 ekv) acetacetonu v 1 ml suchého CCl_4 . Směs byla míchána přes noc, během které došlo k ohřátí na RT. Směs byla filtrována pomocí filtračním nástavcem opatřené injekční stříkačky a podrobena měření spektra $^{31}P\{^1H\}$ -NMR bez dalších úprav.

III. Diskuze

III.1 Cyklizace látek se strukturním motivem PCPCP

Fosfonátové, fosfinátové i fosfinoxidové skupiny mají společnou vlastnost: všechny jsou takzvané elektron odtahující funkční skupiny, někdy označované zkratkou EWG*. Tyto skupiny se vyznačují stabilizací přechodného stavu atomu uhlíku, kdy je záporně nabit a má jeden volný elektronový pár. V případě látek se strukturou PCPCP vzniká tento karbanion odštěpením vodíkového kationtu. Volný elektronový pár může poté atakovat elektronově deficitní atom uhlíku např. v alkyhalidu, jedná se tedy o nukleofilní substituci. Odtržení vodíkového kationtu lze provést pomocí silné báze, jelikož atomy vodíku methylenových můstků jsou velmi slabě kyselé. Jako taková báze může sloužit například hydrid sodný, který je v této práci používán nejčastěji. Předpokládaný průběh reakce (obr. 3.1) nezávisle na variantě reakce je dvoukrokový se stabilním karbaniontem jako meziproduktem.



Obr 3.1 Nukleofilní substituce ve struktuře PCPCP

Při reakci dochází ke vzniku nové vazby uhlík-uhlík a vytvoření chirálního centra na atomu uhlíku struktury PCPCP. Cílem této práce byla syntéza různých kruhů spojující oba methylenové můstky. Z tohoto důvodu byla používána následující dibromovaná alkylační činidla: 1,2-dibromethan, 1,3-dibrompropan a α,α' -dibromo-*o*-xylen. V případě reakce dvakrát bromovaných sloučenin na každém methylenovém můstku dojde k uzavření kruhu (tento jev dále v textu označovaný jako cyklizace). Protože methylenové můstky nesou dva atomy vodíku, může dojít k uzavření druhého kruhu. Kromě reakcí vedoucích k cyklizaci, může docházet i k boční reakci, jejímž produktem je alkylový zbytek navázaný na methylenovém můstku s dvojnou vazbou v terminální poloze, vzniklou eliminací atomu bromu. Takto vzniká struktura PCPCP vinylovaná v případě 1,2-dibromethanu a allylovaná v případě 1,3-dibrompropanu. α,α' -dibromo-*o*-xylen tuto eliminační reakci neumožňuje. Tyto produkty mají stejnou molekulární hmotnost jako produkty cyklizací. Vytváření chirálních center a

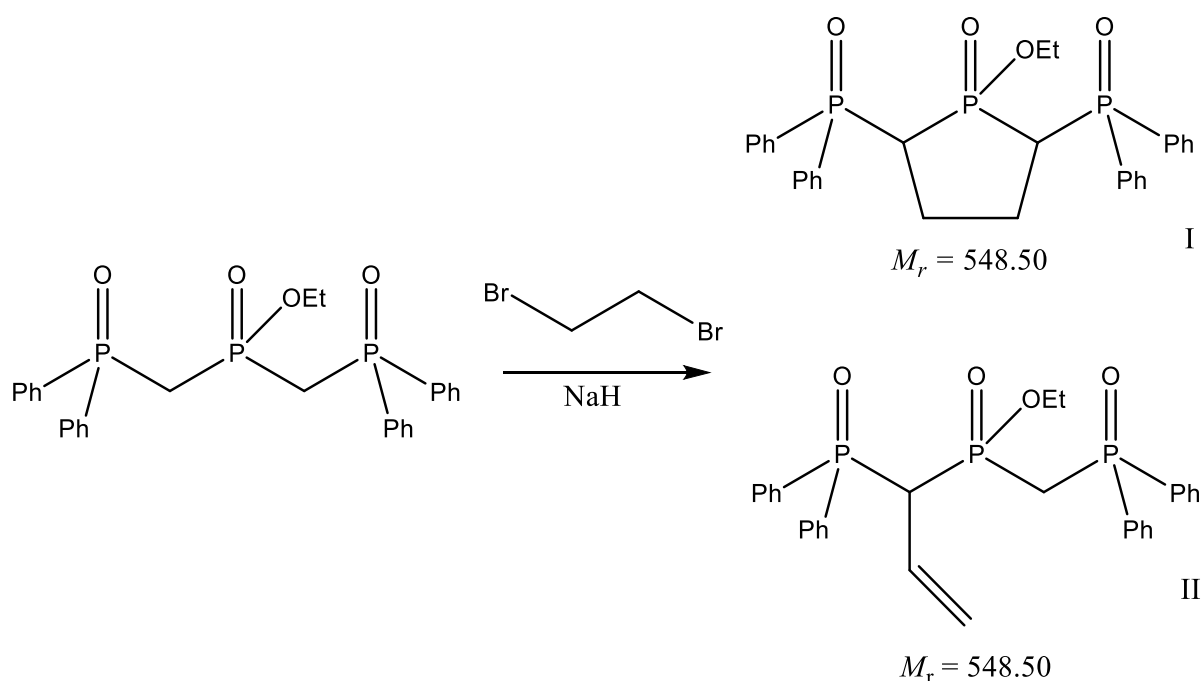
*Electron withdrawing group

bočních produktů vzniklých eliminací vede k velkému množství produktů cyclizačních reakcí. Příklady produktů jsou popsány u jednotlivých experimentů níže.

Protože je v reakci přítomna báze, je nutné zajistit během reakce co nejnižší přítomnost kyselých atomů vodíku. Proto je nutné provádět reakce s PCPCP strukturami ve formách esterů, jinak by docházelo k deprotonaci hydroxidových skupin kyselin.

III.1.1 Syntéza struktur PCPCP s pětičlenným kruhem

Pokusy o uzavření pětičlenného kruhu u látek Et_5L^1 a EtL^2 byly prováděny následujícím způsobem: jako cyclizační činidlo byl používán 1,2-dibromethan a jako báze byl použit 60% NaH v minerálním oleji. Cílem bylo připravit látku **I** popsanou v obr. 3.2. Nezávisle na reakčních poměrech jednotlivých složek však bylo pomocí hmotnostní spektrometrie zjištěno, že nedochází ke kýžené reakci. S největší pravděpodobností je tento jev způsoben náchylností 1,2-dibromethanu k eliminaci v přítomnosti NaH. Ani pokus, kdy bylo do reakce přidáváno střídavě 0,5 ekv. NaH a 0,5 ekv. 1,2-dibromethanu nevedl k cyklickému produktu. Reakce byla vyhodnocena pomocí MS i NMR. Ve spektru MS byl přítomen pouze minimální signál požadované látky (odpovídající cyclizaci) a zároveň byla v ^1H -NMR spektru pozorována přítomnost signálů s posunem odpovídajícím atomům vodíku v sousedství dvojné vazby. V reakci tedy dochází k vinylnaci EtL^2 za vzniku **II**.

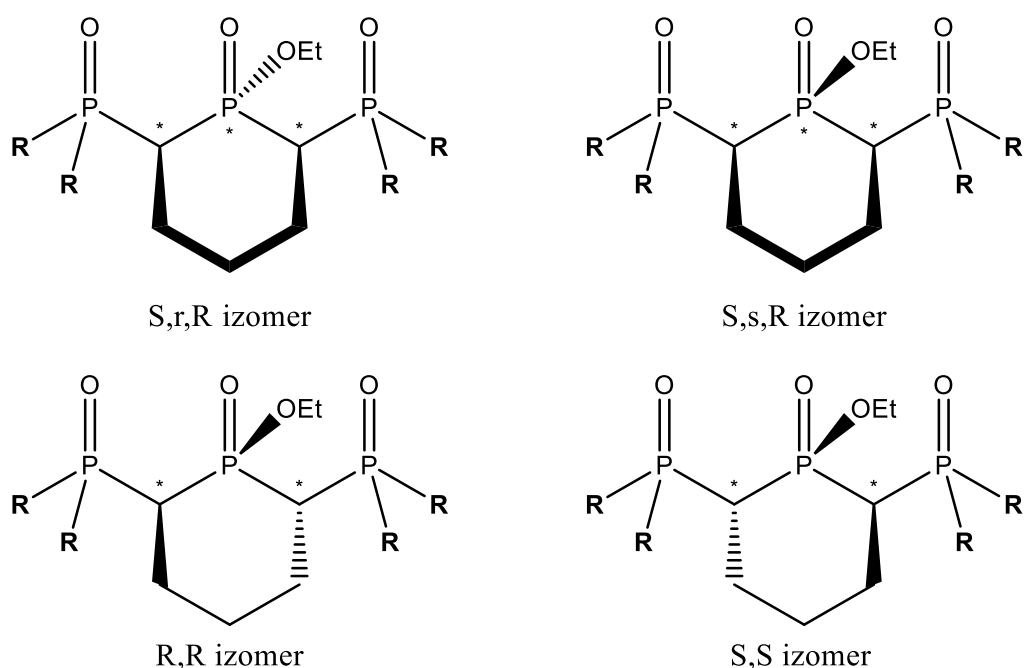


Obr. 3.2: Syntéza pětičlenného kruhu ve struktuře PCPCP a produkt substituce a eliminace

Pozorované hmoty v MS odpovídají částicím vzniklým záchytem iontu Na^+ . Pro zjednodušení interpretace MS spekter byla do vzorků před měřením přidávána jedna kapka 0,1 M roztoku NaOAc, která zvyšovala zastoupení signálu hmoty odpovídajícímu $[\text{LNa}^+]$.

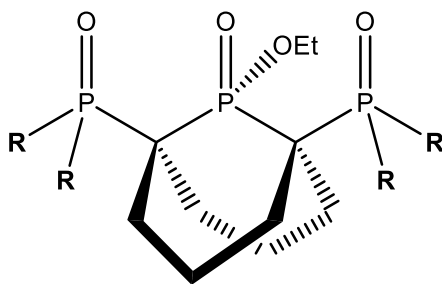
III.1.2 Syntéza struktur PCPCP s šestičlenným kruhem

Pro přípravu struktur obsahující šestičlenný kruh byl jako cyklizační činidlo používán 1,3-dibromethan. Z pokusů provedených jak s látkou Et_5L^1 , tak EtL^2 je patrné, že cyklizace probíhá s větší úspěšností, než v případě kruhů pětičlenných. Pokud vezmeme v úvahu pouze požadované jedenkrát cyklizované produkty reakce (obr. 3.3), můžeme v reakci předpokládat vznik těchto izomerů:



Obr. 3.3: Jedenkrát cyklické produkty cyklizace 1,3-dibrompropanem

V reakci lze předpokládat vznik dvou diastereomerů ($\text{S},\text{r},\text{R}$ a $\text{S},\text{s},\text{R}$) a jednoho enantiomerního páru (R,R a S,S). Tyto látky se liší v jedné velmi podstatné vlastnosti, a to je jejich další reaktivita v prostředí probíhající cyklizace. Dvakrát cyklizovaný produkt (obr. 3.4) totiž může vznikat pouze z izomerů, ve kterých míří šestičlenný kruh na jednu stranu od teoretické plochy procházející motivem PCPCP (v reálné struktuře je tento motiv prolámaný). Vznik zkříženého produktu dvojnásobné cyklizace je nepravděpodobný ze sterického hlediska.



Obr 3.4: Produkt dvounásobné cyklizace

Kromě produktů cyklizace lze předpokládat a také byl pozorován vznik allylovaných produktů kombinace cyklizace a eliminace. Izomery, jak cyklické, tak produkty substituce + eliminace se ukázaly jako v podstatě neoddělitelné, jak pro látky s kostrou fosfonát-fosfinátovou, u kterých nebylo možné provést rozdělení na HPLC vybaveném UV-VIS spektrometrem, kvůli nepřítomnosti absorbujících funkčních skupin, tak u látek s kostrou fosfinoxid-fosfinátovou, které sice absorbující skupiny obsahují, ale hydrofobní vlastnosti molekul mající původ ve fenylových skupinách převažují nad rozdíly způsobené tvarem i počtem cyklů, případně allylových řetězců.

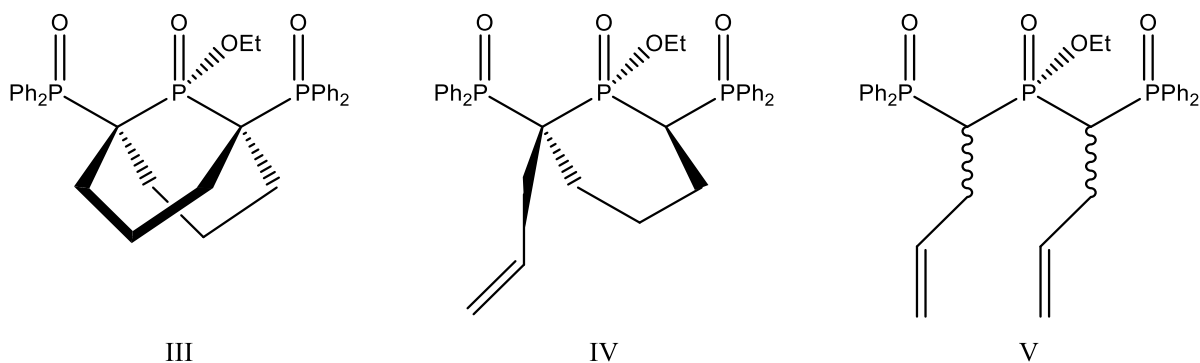
Jedna z nejlépe analyzovatelných směsí byla připravena reakcí EtL^2 s 5 ekvivalenty 1,3-dibrompropanu a 8 ekvivalenty NaH. Vzniklá směs byla rozdělena pomocí FLASH chromatografie, kterou bylo možné odstranit vedlejší neidentifikované produkty reakce neobsahující dle $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR fosfinátové skupiny a získat směs obsahující pouze požadované izomery. Tato směs obsahovala celkem tři výrazné skupiny signálů v $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR spektru (obr. 3.6). Zároveň byl v MS spektru přítomen pouze jeden signál odpovídající molekulové hmotnosti 602, což je hmotnost dvakrát cyklizované částice a také dvakrát allylovaných bočních produktů. Tato směs izomerů byla několikrát čištěna pomocí HPLC, přičemž byla ve výsledku zachycena čistá frakce obsahující symetrický produkt **V** (obr. 3.5). Ve spektru ^1H -NMR se objevují signály s $\delta \approx 6$ ppm, tedy signály odpovídající atomům vodíku v sousedství dvojné vazby. V kombinaci s podmínkou symetrie produktu se tedy mohlo jednat pouze o produkt ve kterém došlo k substituci a eliminaci na každém z methylenových můstků jednou. Zbylé dva produkty (jeden symetrický a jeden nesymetrický) se oddělit pomocí HPLC nepodařilo. Z integrace ^1H -NMR spekter je však možné vydedukovat, že více zastoupenému nesymetrickému signálu náleží dva signály v oblasti dvojné vazby s integrálem 3H (2+1) což odpovídá předpokládané situaci na terminální dvojné vazbě v produktu **IV**, který je výsledkem jedné cyklizace a jedné allylace. Vylučovací metodou pak zbývá poslední signál $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR na symetrický produkt neobsahující dvojné vazby, tedy

cílový dvakrát cyklizovaný produkt **III**. Relativní zastoupení produktů ve směsi a přiřazení $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR signálů je shrnuto v tabulce 3.1.

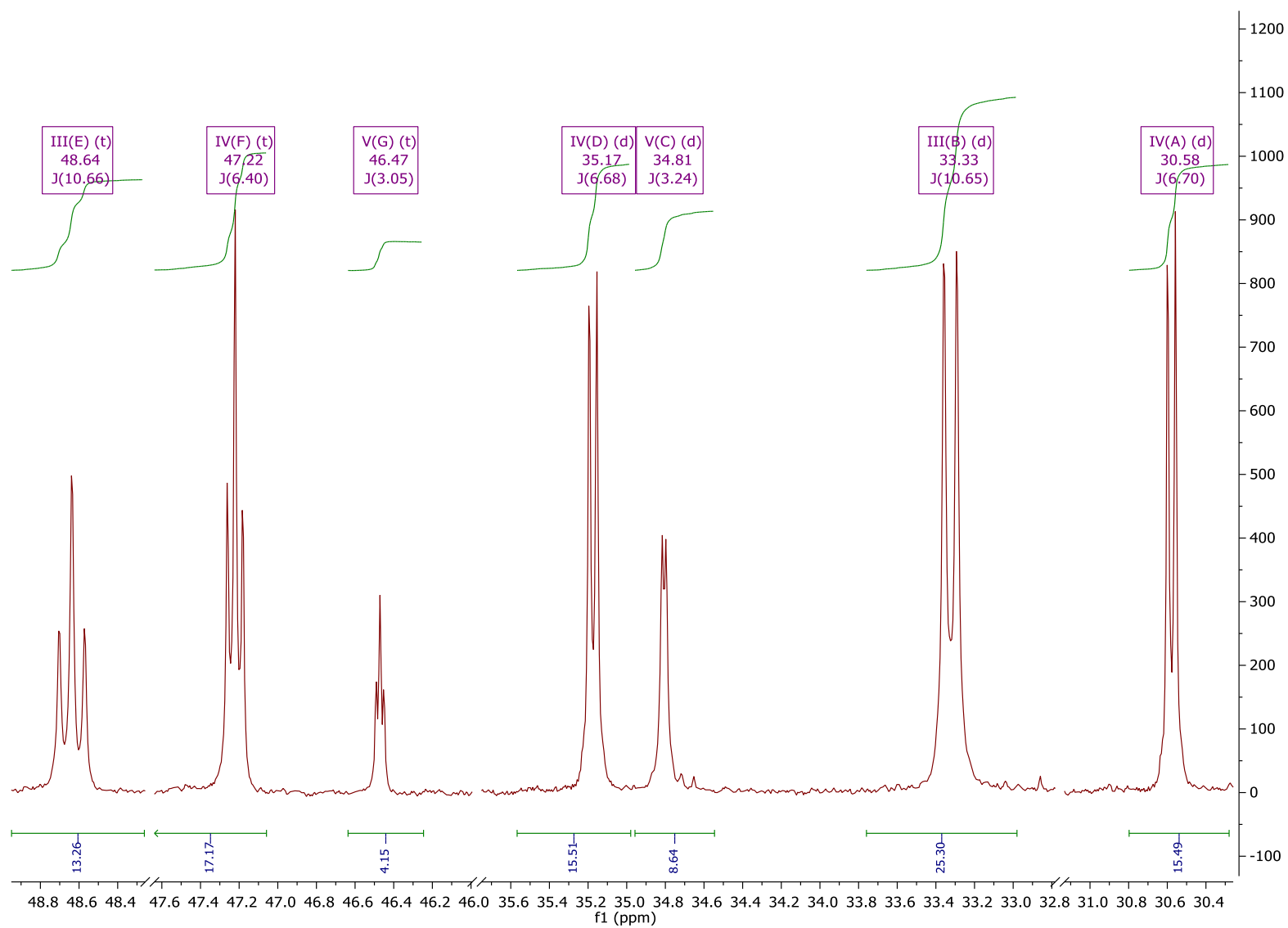
Z tří pozorovaných produktů cyklizace plyne, že v dostatečném nadbytku jak cyklizačního činidla, tak báze dochází k velké preferenci vzniku produktů, ve kterých odreagovaly tři až čtyři atomu vodíku methylenových můstků. Vznik částice **IV** lze přisoudit faktu, že po vzniku R,R nebo S,S izomeru (obr. 3.3) nemůže dojít k další cyklizaci a proto dojde k substituci 1,3-dibrompropanu následované eliminací druhého atomu bromu (vzniku allylové skupiny).

Tab. 3.1: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR signály izomerů cyklizace EtL^2 1,3-dibrompropanem

	^{31}P (POEt) [ppm]	^{31}P (PPh ₂) [ppm]	$^3J_{\text{PP}}$ [Hz]	Zastoupení [%]
III	48.64(E)	33.33(B)	10.66	39
IV	47.22(F)	35.17(D); 30.58(A)	6.68;6.70	48
V	46.47(G)	34.81(C)	3.14	13



Obr. 3.5: Izomery vznikající při cyklizaci EtL^2 1,3-dibrompropanem



Obr. 3.6: Směs tří izomerů cyklizace EtL² pomocí 1,3-dibrompropanu, přiřazení viz tab. 3.1

Směs obsahující všechny tři látky **III**, **IV** a **V** (50 mg) byla vystavena různým hydrolytickým podmínkám. Jednalo se o hydrolýzu v 5 % roztoku hydroxidu sodného, v 3 % roztoku kyseliny chlorovodíkové a v roztoku NaI v EtOH. Do vodných roztoků bylo přidáno 0,5 ml EtOH pro zvýšení rozpustnosti. Tyto směsi byly postupně zahřívány až k teplotě varu a pomocí $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR byly reakce sledovány s cílem identifikovat ideální podmínky hydrolýzy fosfinátové skupiny. Bylo zjištěno, že v případě hydroxidu dochází k rozkladu všech produktů na látky neobsahující fosfinát už při teplotě 60 °C. V případě kyseliny dochází k podobnému rozkladu až při teplotě blízké se 80 °C. V případě NaI, jehož roztok byl zahříván pouze do 60 °C, byl také pozorován rozpad. Tento jev nebyl u látky EtL^2 pozorován ani v refluxující koncentrované kyselině chlorovodíkové. Nestálost produktů cyklizace vůči hydrolytickým podmínkám těchto molekul výrazně snižuje jejich použitelnost jako ligandů pro tvrdé kovy, pro toto použití by bylo ideální připravit tyto molekuly ve formě volných kyselin.

Částice odpovídající hmotností jednou cyklickým, případně jednou eliminovaným produktům je možné pozorovat v MS spektrech při použití nižších množství činidel. Tento jev byl studován pro cyklizaci Et_3L^1 působením 1,1 ekv. 1,3-dibrompropanu a 2,1 ekvivalentu NaH. V hmotnostním spektru jsou zastoupené hmoty přiřaditelné k jak jednou, tak dvakrát cyklizovaným/allylovaným produktům. Množství izomerů pozorované v $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR spektru se pohybuje kolem šesti. Vzhledem k nepřítomnosti fenylových skupin umožňující pozorování izomerů pomocí HPLC kolony následované UV-VIS detektorem jako v případě cyklických produktů EtL^2 nebyla tato směs dále dělena. Nejmenšího počtu majoritně vznikajících izomerů bylo dosaženo při reakčním poměru 2,2 ekvivalenty 1,3-dibrompropanu a 4,4 ekvivalenty NaH. V tomto případě jsou v $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR spektru pozorovatelné tři majoritní izomery **VI**, **VII** a **VIII**(tab. 3.2). Tato směs byla dále studována pomocí HPLC-MS, které v první řadě umožnilo určit molekulové hmotnosti náležející k jednotlivým signálům na základě integrace a v řadě druhé pozorovat další produkty reakce, jejichž signály nejsou v NMR pozorovatelné.

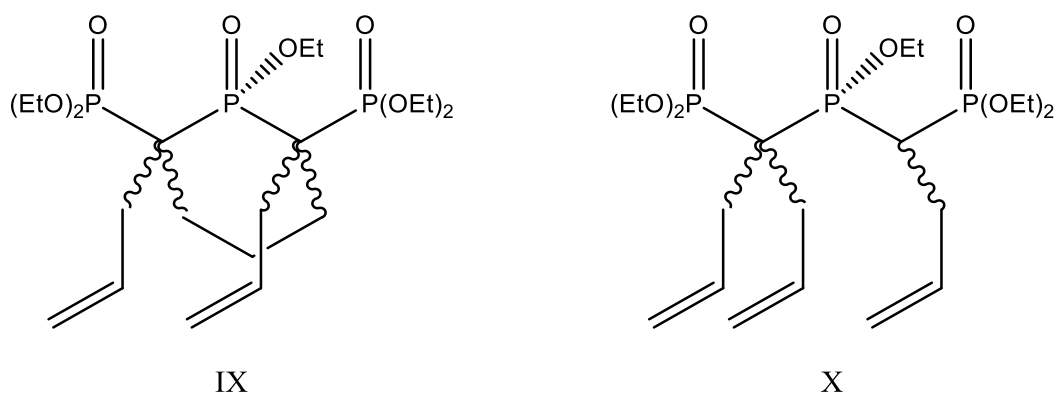
Pro $M_r = 434$, odpovídající jedné cyklizaci/allylaci jsou ve směsi přítomny dva srovnatelně zastoupené izomery (**VI**, **VII**) s velmi blízkými retenčními faktory. Dle NMR jsou obě tyto molekuly nesymetrické. Jestli se jedná o produkty allylace či cyklizace se nepodařilo pomocí ^1H -NMR rozlišit.

Izomery vzniklé dvěma cyklizacemi/allylacemi ($M_r = 474$) dle LC-MS vznikají celkem tři. Tyto látky se vyznačují většími rozdíly v retenčních faktorech než látky o rel. hmotnosti 434. Nejzastoupenější látka z této trojice byla identifikována jako látka **VII**.

Oproti cyklizaci EtL^2 , kde tento jev pozorován nebyl vůbec, dochází v malém množství i k reakci se třemi podíly 1,3-dibrompropanu a vzniku částic s $M_r = 514$. Této hmotě odpovídají dva signály v LC-MS o celkovém integrálu 1,5 %. Může se jednat jak o variantu **IX** s jedním cyklem a dvěma allylovými zbytky (dva diastereomery), tak o látku **X** se třemi allylovými zbytky (také dva diastereomery) viz obr 3.7. LC-MS neumožňuje snadný přechod do preparativní škály, a protože se nepodařilo získat pro tuto směs izomerů použitelné ^1H -NMR spektrum, nebyly izomery dále rozlišovány. Z integrací ^{31}P -NMR spektra a chromatogramu lze však určit, že hlavní produkt reakce, který vzniká ze 30 %, je dvakrát asymetricky allylovaný produkt **VIII** a požadovaný dvakrát cyklizovaný produkt nevzniká v zastoupení větším než 10 %.

Tab. 3.2 Hlavní produkty cyklizace Et_5L^1

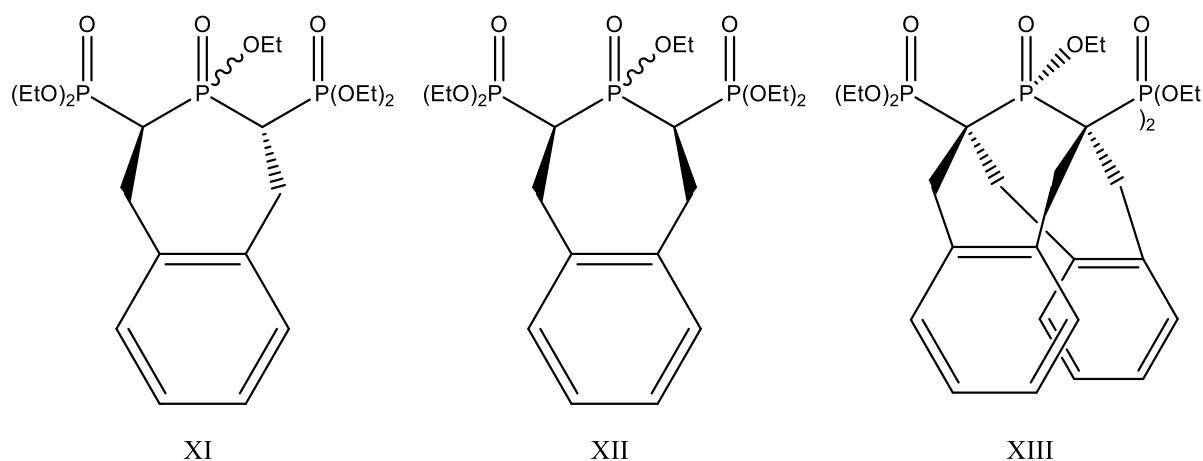
	^{31}P (OEt) [ppm]	^{31}P (POEt) [ppm]	$^3J_{\text{PP}}$ [Hz]	M_r	Zastoupení [%]
VI	46.9 dd	25.4 d 17.8 d	1.83 18.2	434	26
VII	44.3 dd	25.4 d 20.9 d	13.7 19.6	434	19
VIII	42.2 dd	25.4 d 20.4 d	13.3 8.3	474	30



Obr. 3.7: Produkty trojnásobné cyklizace/allylace Et_5L^1

III.1.3 Cyklizace Et_3L^1 pomocí α,α' -dibrom-*o*-xylenů

Nepřítomnost skupin absorbujících UV záření představovala velký problém pro dělení izomerů vznikajících při cyklizaci Et_3L^1 . Pokus o vnesení aromatického jádra do molekuly byl proveden použitím α,α' -dibrom-*o*-xylenů jako cyklizačního činidla. V případě úspěšné cyklizace by došlo k uzavření sedmičlenného kruhu s jednou stranou tvořenou benzenovým jádrem. U tohoto cyklizačního činidla zároveň nemůže docházet k eliminaci.



Obr. 3.8: Produkty cyklizace s α,α' -dibrom-*o*-xylenem.

Cyklizace α,α' -dibrom-*o*-xylenem se liší od cyklizace 1,3-dibrompropanem především menší preferencí tvořit dvakrát cyklizované látky. Při použití pouze 2 ekvivalentů NaH a 1,5 ekvivalentu cyklizačního činidla je možné připravit směs obsahující látky s hmotností odpovídající jedné cyklizaci ($M_r = 519$). Jedná se o dva izomery **XI** (51 %) a **XII** (37 %). Na základě vymizení produktu **XII** v případě použití většího množství NaH a cyklizačního činidla (4 ekvivalenty) lze usoudit, že se jedná o jeden z izomerů s kruhem vedoucím na stejnou stranu plochy tvořené strukturou PCPCP. Signál fosfinátové skupiny je rozšířený triplet. Toto rozšíření je pravděpodobně způsobeno překryvem signálů S,s,R a S,r,R izomerů (viz obr. 3.3).

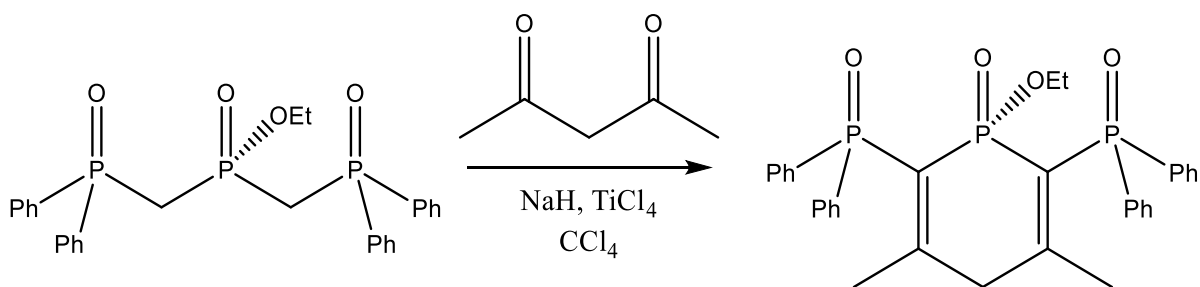
Zároveň s vymizením signálu látky **XII** vzniká symetrická, dvakrát cyklizovaná látka **XIII** (obr. 3.8). Charakterizace jednotlivých molekul je shrnuta v tabulce 3.3. Stejně jako v ostatních pokusech o syntézu se produkty nepodařilo ani pomocí HPLC rozdělit. Na základě poměru vzniku částic **XI** a **XII** je možné pozorovat, že α,α' -dibrom-*o*-xylen nepreferuje významně vytváření S,R izomerů, i když by tomu jeho struktura napovídala.

Tab. 3.3: Charakterizace izomerů vznikajících při cyklizaci Et_5L^1 α,α' -dibrom-o-xylenem.

	^{31}P (POEt) [ppm]	^{31}P (P(OEt) ₂) [ppm]	$^3J_{\text{PP}}$ [Hz]	M_r
XI	43.9 dd	26.4 d 20.5 d	20.7 18.5	519
XII	38 m	–	–	519
XIII	53.8 t	26.9 d	9.3	621

III.1.4 .Cyklizace pomocí acetylacetonu

V literatuře byly popsány reakce bis(fosfonátů) s aldehydy, ve kterých docházelo k substituci obou atomů vodíku methylenových můstků za vzniku dvojné vazby (obr. 3.9). Tato reakce by představovala cestu k cyklickým produktům bez množství izomerů (jak konstitučních, tak stereoizomerů). V literatuře^[37] už byl dříve popsán pokus o substituci atomů vodíku ve struktuře podobné Et_5L^1 v prostředí silné báze (NaH) a benzaldehydu. Ke vzniku dvojné vazby na methylenových můstcích však nedocházelo. TiCl_4 by měl podle článku týkajícího se bis(fosfonátů)^[31] tuto reakci usnadňovat. Ukázalo se však, že ani katalytický efekt chloridu titaničitého nepřeváží vliv fosfinátové skupiny. Ani jednu z látek Et_5L^1 a EtL^2 se nepodařilo za těchto podmínek ani benzylovat pomocí benzaldehydu, ani cyklizovat pomocí acetylacetonu.



Obr. 3.9: Cyklizace pomocí acetylacetonu

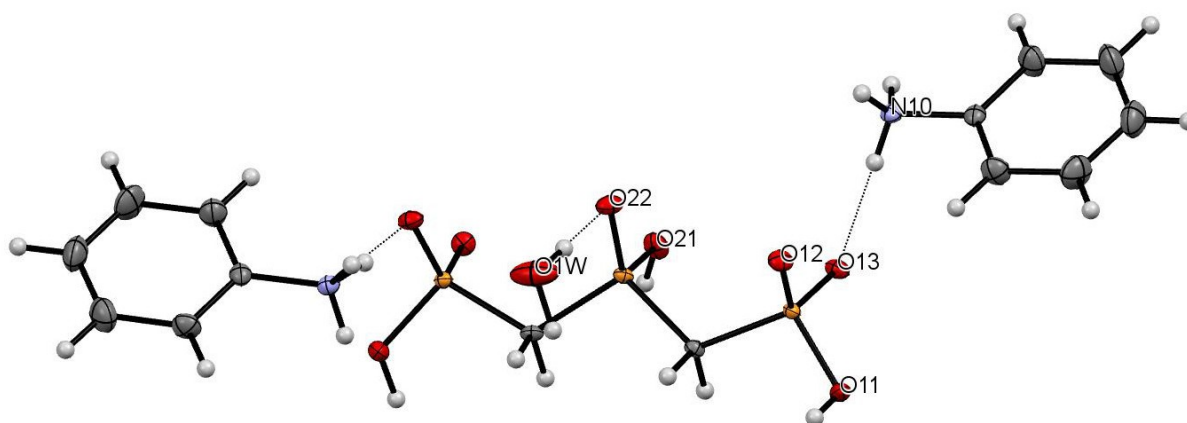
III.2 Studie látek H_5L^1 a HL^2 v pevném stavu

Studium látek pomocí rentgenové strukturní analýzy je možné pouze u látek připravených ve formě monokrystalů. Podmínkou existence krystalu je opakující se struktura jejíž výsledný náboj je nulový. Pro krystalizaci silně ionizovaných polárních ligandů se často používají objemné aminy, případně aminy obsahující hydrofobní skupinu, která sníží rozpustnost vznikající komplexní částice v polárním rozpouštědle, ze kterého je krystalizace prováděna. Polární rozpouštědlo je nutné pro převedení silně polárních ligandů do roztoku.

Proto byly pro pokusy o krystalizaci H_3L^1 použity aminy jako cyklohexylamin (který byl použit pro čištění kyseliny), anilin nebo pyridin, ale také lineární polyaminy. Vhodné krystaly byly však získány pouze pro sůl anilinia.

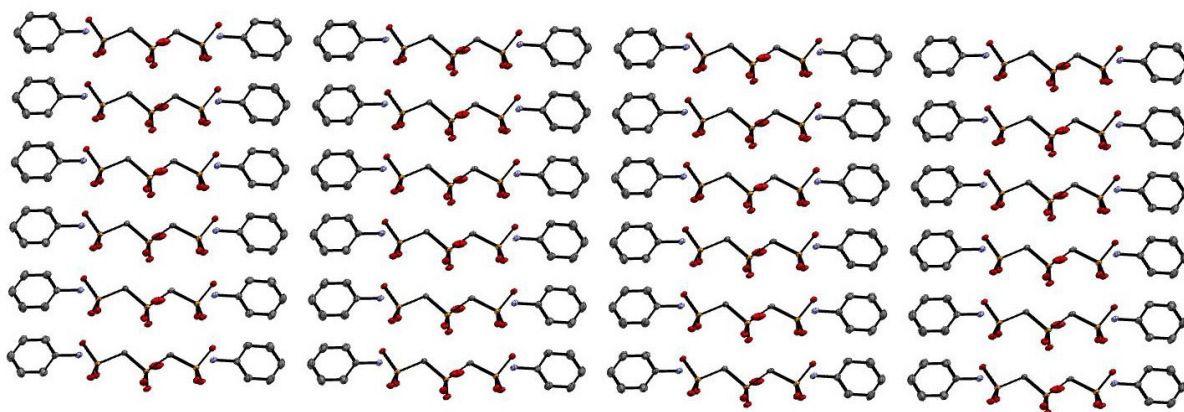
III.2.1 Struktura monohydrátu dianilinium bis(methylenfosfonáto)fosfinátu

Aniliniová sůl kyseliny bis(methylenfosfonáto)fosfinátové na rozdíl od soli cyklohexylamoniové krystalizovala v poměru 2 molekuly aminu na jednu molekulu $(H_3L^1)^{2-}$, která je protonizována symetricky na každé funkční skupině jednou (obr. 3.10).



Obr. 3.10 Struktura $(PhNH_3)_2H_3L^1 \cdot H_2O$

Struktura obsahuje střídající se vrstvy ligandu a vrstvy tvořené páry aniliniových kationtů (obr. 3.11) otočených k sobě hydrofobním benzenovým jádrem (a tedy amoniovými skupinami otočenými k vrstvám ligandu). V molekule je přítomno velké množství vodíkových vazeb. Protonizovaný atom kyslíku O11 tvoří vodíkovou vazbu ke kyslíku O12 sousední jednotky. Deprotonizovaný atom kyslíku O12 tvoří dvě vodíkové vazby: jednu k protonizovanému atomu kyslíku O11 sousední jednotky a jednu k amoniové skupině anilinia sousední jednotky. Druhý deprotonizovaný atom kyslíku O13 tvoří jednu vodíkovou vazbu k amoniové skupině anilinia náležejícího stejné jednotce a jednu vodíkovou vazbu k aniliniu sousední jednotky. Kromě vodíkových vazeb mezi fosfonátovými skupinami a aniliniem vznikají ještě vodíkové vazby přes můstkující molekulu vody: Jedna vodíková vazba vzniká mezi protonizovaným atomem O21 a molekulou vody v sousední jednotce, další dvě tvoří deprotonizovaný atom kyslíku O22 ke dvěma různým molekulám vody, jedna z nich se nachází ve stejné jednotce (O1W). Ve struktuře je přítomno 13 různých vodíkových vazeb, jejichž délky jsou shrnuty v tabulce 3.4. V tabulce nejsou zahrnuty interakce druhého fosfonátu a dalších molekul vody, protože jsou jak pro fosfonáty, tak pro vodu obdobné.



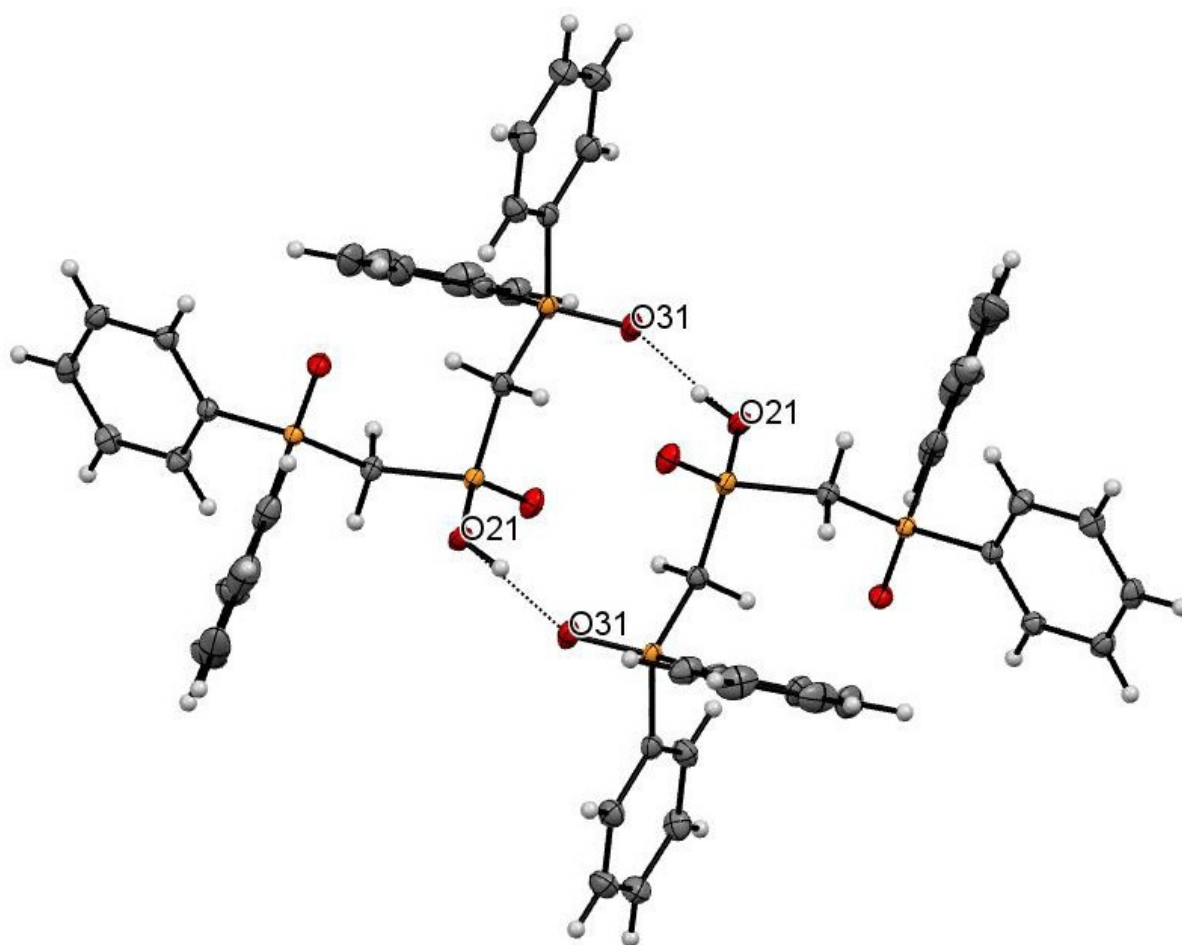
Obr. 3.11: Struktura vrstev $(\text{PhNH}_3)_2\text{H}_3\text{L}^1\cdot\text{H}_2\text{O}$, atomy vodíku nejsou zobrazeny.

Tab. 3.4: Vybrané vodíkové vazby přítomné v $(\text{PhNH}_3)_2\text{H}_3\text{L}^1\cdot\text{H}_2\text{O}$, # označuje atomy sousedních jednotek

Atomy	Délka [Å]
O12 – O11 [#]	2,599
O13 – N10	2,711
O12 – N10 [#]	2,747
O22 – O1W	2,825
O21 – O1W [#]	2,52
O12 – O11 [#]	2,599

III.2.2 Struktura kyseliny HL^2

Na rozdíl od kyseliny H_5L^1 je aniont $(\text{L}^2)^-$ výrazně méně polární a zároveň sám obsahuje hydrofobní funkční skupiny, a to až v takové míře, že HL^2 není rozpustná ve vodě a v methanolu je rozpustná pouze za horka. Ke krystalizaci došlo při ochlazování směsi během pokusu o přípravu komplexů. Vzhledově stejné bezbarvé krystaly se vyloučily ze směsi s chloridem zinečnatým i nikelnatým. K vytvoření komplexů tedy vůbec nedošlo. Krystalová struktura obsahuje pouze jeden typ vodíkové vazby, a to mezi protonizovaným atomem kyslíku O21 na fosfinátu a atomem kyslíku O31 fosfinoxidové skupiny (obr 3.12). Tato interakci spojuje molekuly HL^2 po dvojicích, s délkou vodíkové vazby 2.522 Å. Hydrofilní fosfinátové funkční skupiny jsou ve struktuře obklopeny hydrofobními fenyle. Jasně vrstevnatá struktura v krystalu neexistuje.



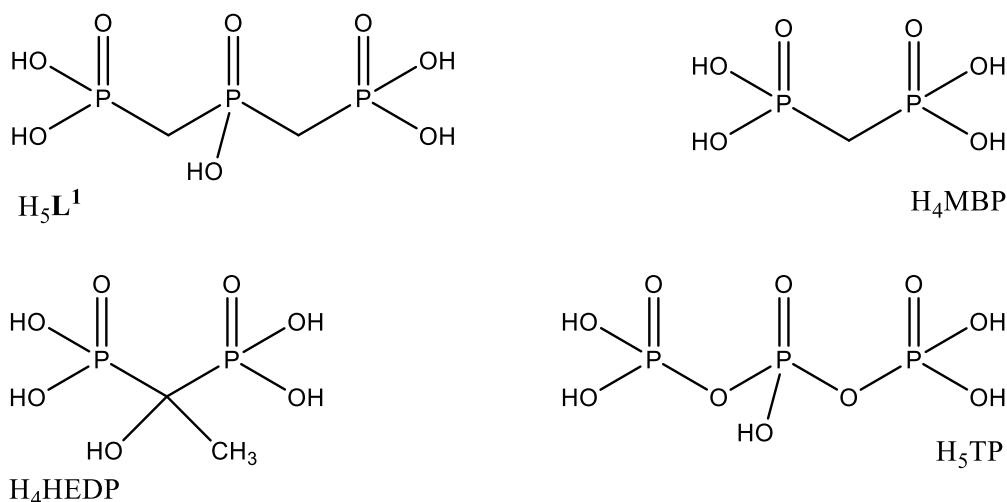
Obr. 3.12: Struktura HL^2 v pevném stavu

Tab. 3.5: Vybrané RTG parametry získaných monokrystalů

	(PhNH ₃) ₂ H ₃ L ¹ ·H ₂ O	HL ²
Vzorec	C ₂ H ₇ O ₈ P ₃ ·2(C ₆ H ₈ N)·H ₂ O	C ₂₆ H ₂₅ O ₄ P ₃
M_r	458,27	494,37
Barva	Bezbarvý	Bezbarvý
Rozměry [mm]	0,052×0,094×0,50	0,37 × 0,26 × 0,15
Soustava	Monoklinní	Monoklinní
Prostorová grupa	<i>Cc</i>	P2 ₁ / <i>n</i>
a [Å]	36,9661 (13)	10,9330 (4)
b [Å]	6,9958 (2)	8,6064 (3)
c [Å]	7,9446 (3)	25,0075 (8)
β [°]	90,362 (1)	98,814 (1)
V , [Å ³]	2054,49 (12)	2325,26 (14)
Z	4	4
D_c [g·cm ⁻³]	1,482	1,412
μ [mm ⁻¹]	0,34	0,29
F(000)	960	1032
Počet nez. difrakcí	4006	5335
Počet pozorovaných difrakcí ($I > 2\sigma(I)$)	3731	4801
Data; omezení; parametry	4006; 2; 290	5335; 0; 302
g.o.f.	1,047	1,052
$R_1(I > 2\sigma(I))$	0,029	0,0289
wR_2	0,0699	0,0747
Zbytková difrakční maxima; minima [e·Å ⁻³]	0,50; - 0,26	0,33; - 0,35

III.3 Potenciometrické studie H_5L^1

Potenciometrické titrace byly prováděny s kyselinou H_5L^1 vyčištěnou pomocí srážení s cyklohexylaminem a převedenou zpět do formy volné kyseliny na iontoměničích s SO_3H skupinami. Látka takto dosáhla čistoty blíží se 100 %, nutné pro spolehlivost dat. Koncentrace ligandu v roztocích činila přibližně 0,004 M, přesné látkové množství bylo zjištěno při stanovování konstant kyselosti pomocí programu OPIUM. Studovány byly interakce s vybranými ionty přechodných kovů a dále s ionty lithnými a vápenatými. Pokud to bylo možné, byla získaná data porovnána s chováním kyseliny 1-hydroxyethan-1,1-bisfosfonové (H_4HEDP), methylenbis(fosfonátu) (H_4MBP) a kyseliny trifosforečné (H_5TP) (obr. 3.13).



Obr. 3.13: Ligandy srovnávané s H_5L^1 v potenciometrické studii stability komplexů s ionty vybraných kovů

III.3.1 Stanovení disociačních konstant H_5L^1

H_5L^1 je pětisytná kyselina, jejíž 4 disociační konstanty byly již dříve stanoveny přibližně pomocí NMR titrace.^[17] Potenciometrické stanovení těchto konstant všeobecně dosahuje lepších výsledků, navíc systém $NMe_4OH-HCl$ představuje skutečně indiferentní systém, na rozdíl od v NMR použitého systému $NaOH-HCl$. Stejně jako v NMR titraci byly určeny pouze 4 disociační konstanty, pátá disociační konstanta patrně náležící fosfinátové skupině leží v oblasti nedosažitelné potenciometrickou titrací. V roztoku se nachází v rozsahu pH 1 – 12 pět pozorovatelných forem kyseliny (obr. 3.14). Celkové protonizační jsou shrnuty v tabulce 3.6.

Ve srovnání s H_5TP jsou disociační konstanty vyšší (tab. 3.7), což je způsobeno vyšší elektronovou hustotou na atomech fosforu způsobenou náhradou kyslíkatých můstků methylenovými. Pomocí NMR titrace bylo určeno, na kterých funkčních skupinách

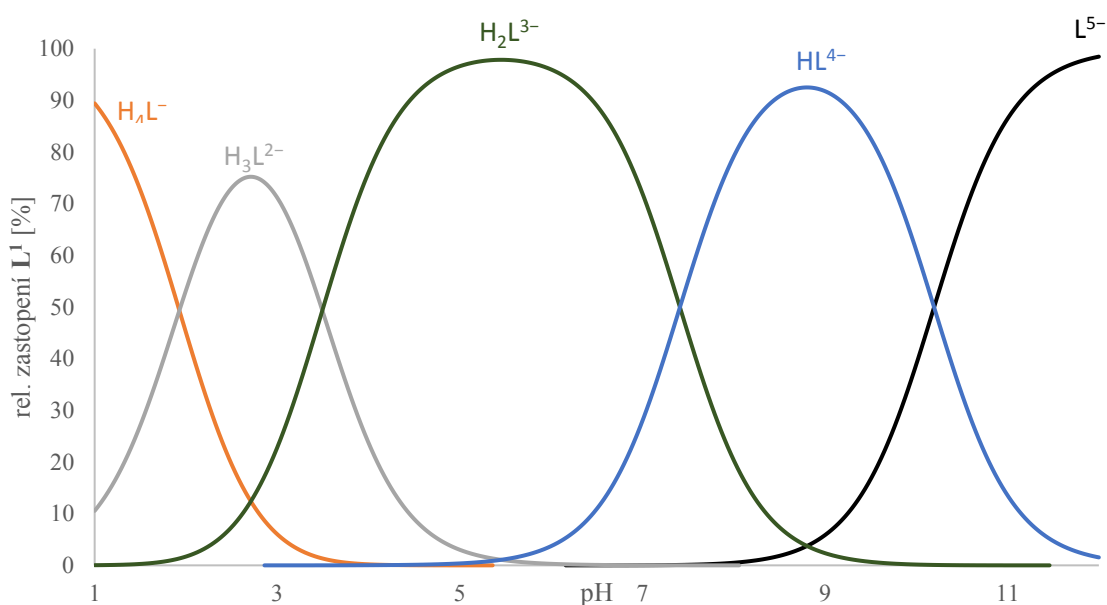
k protonizaci pravděpodobně dochází. Jako první disocijuje fosfinová skupina. Při deprotonizaci částice $(\text{H}_4\text{L}^1)^-$, která je symetricky protonizována na fosfonátových funkčních skupinách, dochází k přesunu jednoho vodíkového kationtu na fosfinátovou skupinu, pravděpodobně kvůli elektrostatickému odpuzování nabitých částic. Tento jev je pozorovatelný na fosfonátových signálech v NMR titraci (obr. 3.19). V oblasti pH kolem 3 se na křivce nachází lokální minimum.^[17] Následně dochází k opětovné disociaci fosfinové kyseliny. Anoint $(\text{H}_2\text{L}^1)^{3-}$ je protonizován symetricky na fosfonátových skupinách.

Tab. 3.6: Celkové protonizační konstanty H_5L^1

	$\log \beta$ z potenc. tit.	$\log \beta$ z NMR tit. ^[17]
$\log \beta (\text{HL}^1)$	$10,19 \pm 0,01$	$10,7 \pm 0,1$
$\log \beta (\text{H}_2\text{L}^1)$	$17,61 \pm 0,02$	$18,5 \pm 0,1$
$\log \beta (\text{H}_3\text{L}^1)$	$21,10 \pm 0,02$	$22,0 \pm 0,1$
$\log \beta (\text{H}_4\text{L}^1)$	$23,03 \pm 0,02$	$23,3 \pm 0,1$

Tab 3.7: Disociační konstanty H_5L^1 ve srovnání s příbuznými ligandy

	H_5L^1	$\text{H}_5\text{TP}^{[35]}$	$\text{H}_4\text{MBP}^{[35]}$
$\text{pK}_a (\text{HL}^1)$	10,19	7,67	10,6
$\text{pK}_a (\text{H}_2\text{L}^1)$	7,41	5,33	7,05
$\text{pK}_a (\text{H}_3\text{L}^1)$	3,49	1,9	2,67
$\text{pK}_a (\text{H}_4\text{L}^1)$	1,93	0,9	1,7
$\text{pK}_a (\text{H}_5\text{L}^1)$	$\approx < 1$	0,5	–



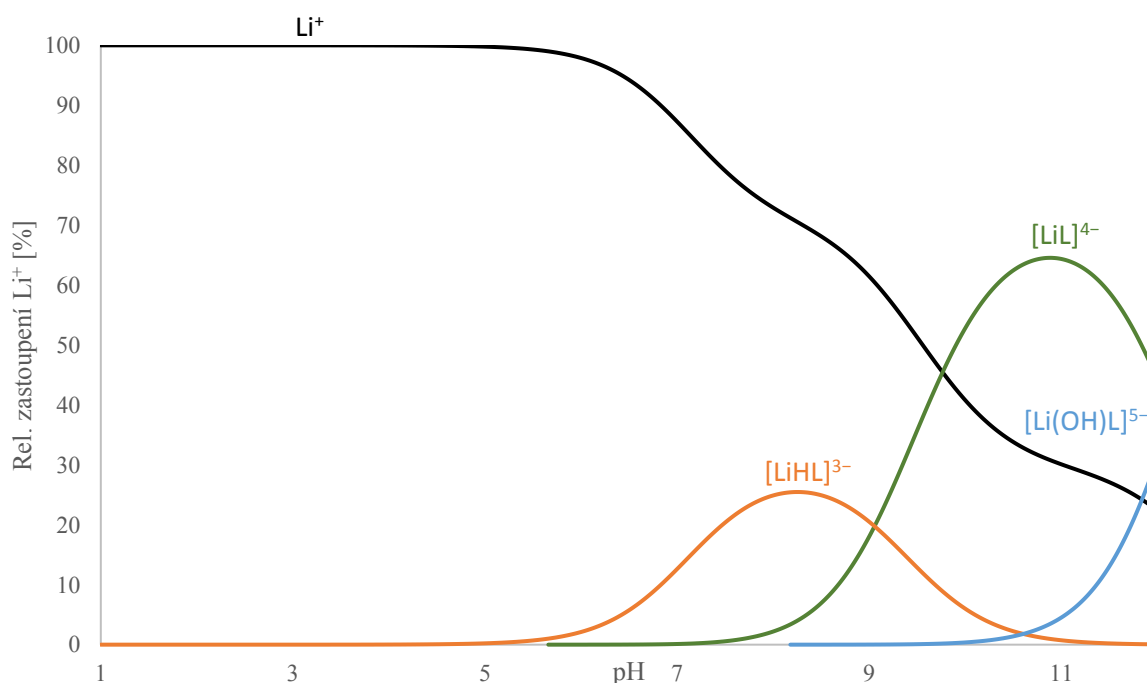
Obr. 3.14: Distribuční diagram různě protonizovaných forem kyseliny H_5L^1

III.3.2 Interakce H_5L^1 s lithnými kationty v roztoku

K interakci s lithnými ionty dochází až od pH 5, kde dochází k formaci komplexní částice $[LiHL^1]^{3-}$. V roztoku jsou přítomny volné kationty Li^+ v celé škále pH (obr. 3.15), z čehož plyne, že komplexy H_5L^1 s lithiem jsou méně stabilní než komplexy s přechodnými kovy. Konstanty stability jsou shrnuty v tab. 3.8. V roztoku se od pH 10 začíná objevovat částice $[Li(OH)L^1]^{6-}$. Toto chování je nestandardní, protože částice s takto vysokým nábojem se v roztocích většinou nevyskytují. V tabulce 3.8 jsou shrnuty konstanty $\log\beta$ popisující vznik komplexů z jednotlivých složek. V případě $\log\beta$ hydroxokomplexů jsou mezi produkty zahrnuty i protony vniklé deprotonizací H_2O , tedy $[M(OH)_nL][H]^n/[M][L]$. Tento způsob zápisu je používán ve všech tabulkách popisujících chování komplexů.

Tab. 3.8: Konstanty stability a protonizační konstanty v systému $Li^+ - H_5L^1$

	H_5L^1 $\log\beta$	H_5L^1 $\log K$	H_5TP $\log K$	H_4MBP $\log K$
$[LiL]$	$3,30 \pm 0,04$	$3,30^*$	$2,87^*$	$2,48^*$
$[LiHL]$	$12,36 \pm 0,07$	$9,06^\dagger$	$7,63^\dagger$	$8,32^\dagger$
$[Li(OH)L]$	$-8,84 \pm 0,04$	$12,14^\ddagger$	—	—



Obr. 3.15: Distribuční diagram komplexů H_5L^1 s Li^+

* $[LiL]/[Li][L]$

† $[LiHL]/[LiL][H]$

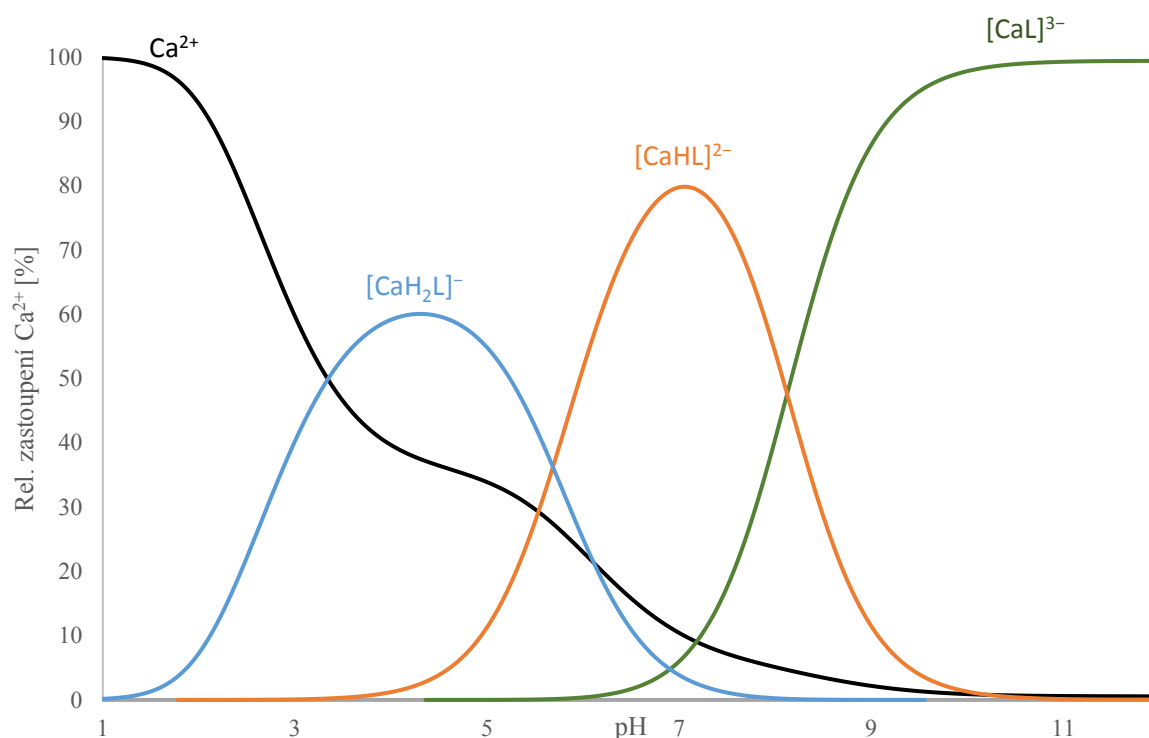
‡ $[LiL]/[Li(OH)L][H]$

III.3.3 Interakce H_5L^1 s vápenatými kationty v roztoku

S vápenatými kationty vytváří H_5L^1 stabilnější komplexy než s lithnými (tab. 3.9). Komplexy se vytváří už od pH 4. První se tvoří komplex $[CaH_2L]^+$, který se při zvyšování pH postupně deprotonizuje (obr. 3.16). Volné vápenaté kationty se přestávají vyskytovat v roztoku až v bazické oblasti. Hydroxokomplex popsaný pro kyselinu trifosforečnou pozorován nebyl. Vápenaté kationty tedy tvoří výjimku, s ostatními zkoumanými kovy tvoří H_5L^1 hydroxokomplexy ochotněji. Vzhledem k faktu, že byla titrace prováděna pouze v stechiometrickém poměru $Ca^{2+}:L^1$ 1:1, nelze s jistotou vyloučit existenci komplexu $[M_2L]$, který byl popsán s konstantou stability $\log\beta = 9,81$ pro H_4MBP .

Tabulka 3.9: Konstanty stability a protonizační konstanty $Ca^{2+}-H_5L^1$

	H_5L^1 $\log\beta$	H_5L^1 $\log K$	H_5TP $\log K$	H_4MBP $\log K$
$[CaL]$	$6,89 \pm 0,08$	$6,89^*$	$6,38^*$	$6,00^*$
$[CaHL]$	$15,01 \pm 0,07$	$8,12^\dagger$	$6,14^\dagger$	$7,49^\dagger$
$[CaH_2L]$	$20,70 \pm 0,05$	$5,69^\ddagger$	—	—



Obr 3.16: Distribuční diagram komplexů H_5L^1 s Ca^{2+}

* $[CaL]/[Ca][L]$

† $[CaHL]/[CaL][H]$

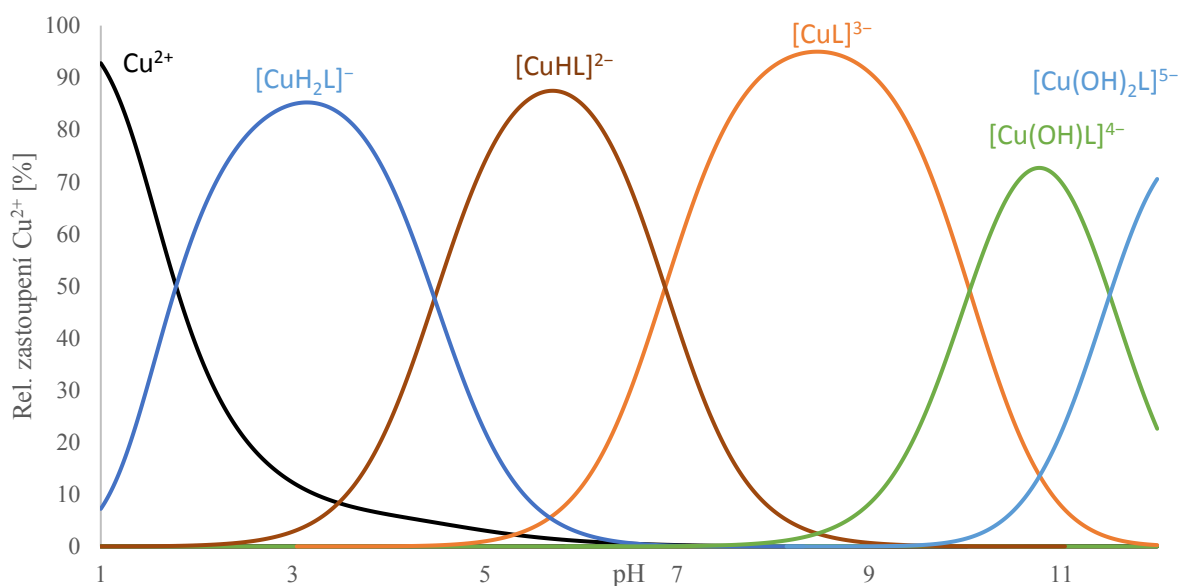
‡ $[CaH_2L]/[CaHL][H]$

III.3.4 Interakce H_5L^1 s měďnatými kationty v roztoku

S měďnatými kationty tvoří ligand H_5L^1 stabilnější komplexy než s kovy prvních dvou skupin podle očekávání (tab 3.10). Stejně jako u lithných kationtů existují v bazické oblasti dva hydroxokomplexy $[Cu(OH)L^1]^{6-}$ a $[Cu(OH)_2L^1]^{7-}$ s velkým záporným nábojem. $[Cu(OH)L^1]^{6-}$ existuje v roztoku už od pH = 8 (obr 3.17), výrazně dříve než v případě lithných kationtů. Vznik komplexů v poměrech L:M jiných než 1:1 nebyl pozorován ani při titracích v poměrech 1:2 a 2:1 (v případě titrace v přebytku kovu docházelo k vyloučení nerozpustných látek a titrace musela být ukončena.)

Tabulka 3.10: Konstanty stability a protonizační konstanty systému $Cu^{2+} - H_5L^1$

	H_5L^1 $\log\beta$	H_5L^1 $\log K$	H_5TP $\log K$	H_4HEDP $\log K$
$[CuL]$	$11,05 \pm 0,02$	$11,05^*$	$9,4^*$	$6,38^*$
$[CuHL]$	$19,92 \pm 0,02$	$8,87^\dagger$	$4,37^\dagger$	$9,05^\dagger$
$[CuH_2L]$	$22,39 \pm 0,01$	$2,47^\ddagger$	—	$5,26^\ddagger$
$[Cu(OH)L]$	$1,00 \pm 0,04$	$10,04^\S$	—	—
$[Cu(OH)_2L]$	$-10,51 \pm 0,04$	$11,51^{**}$	—	—



Obr. 3.17: Distribuční diagram komplexů H_5L^1 s Cu^{2+}

* $[CuL]/[Cu][L]$

† $[CuHL]/[CuL][H]$

‡ $[CuH_2L]/[CuHL][H]$

§ $[CuL]/[Cu(OH)L][H]$

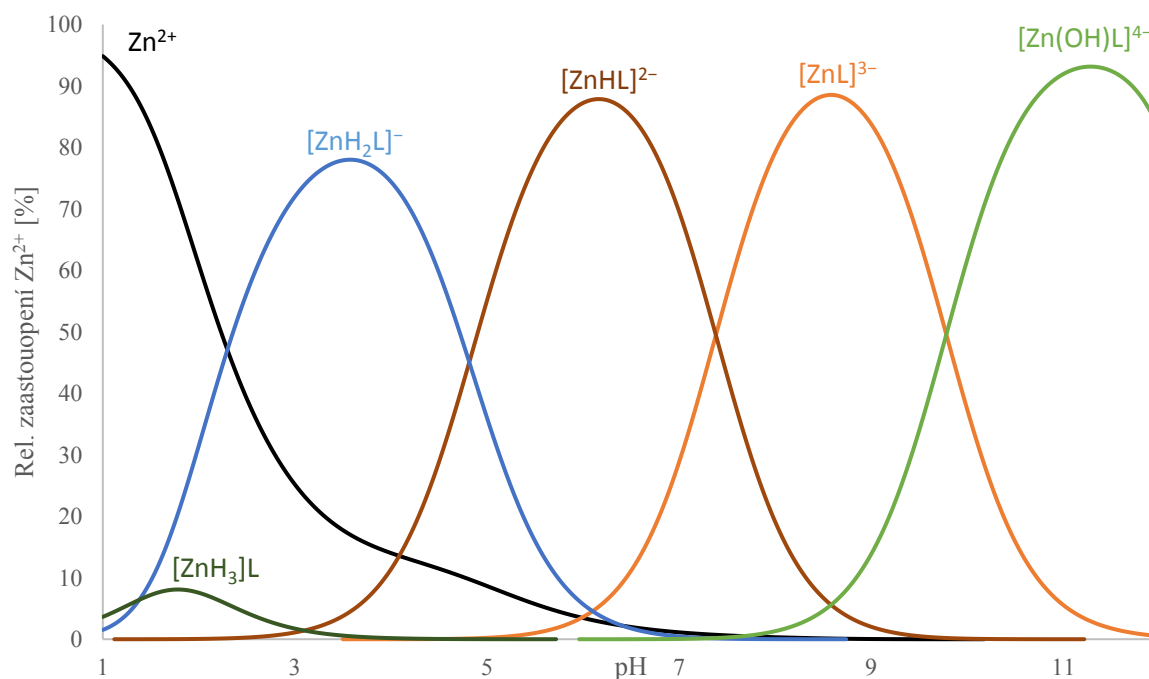
** $[Cu(OH)L]/[Cu(OH)_2L][H]$

III.3.5 Interakce H_5L^1 se zinečnatými kationty v roztoku

U zinku pozorujeme vznik elektroneutrální částice $[ZnH_3L^1]$, která se u mědi v roztoku nevyskytuje, i když s maximem pouhých 8 % (obr. 3.18). Podobně jako v případě měďnatých kationtů dochází kolem $pH = 8$ ke vzniku hydroxokomplexu $[Zn(OH)L]^{4-}$, dihydroxokomplex se v roztoku však nevyskytuje (tab. 3.11). Stejně jako u měďnatých komplexů nebyly pozorovány částice s jiným poměrem $Zn^{2+}:L^1$ než 1:1. Konstanta stability částice $[ZnL^1]^{3-}$ je nižší než u měďnatých kationtů, pořadí stability komplexů odpovídá Irwing-Wiliamsově řadě.

Tabulka 3.11: Konstanty stability komplexů s Zn^{2+}

	H_5L^1 $\log\beta$	H_5L^1 $\log K$	H_5TP $\log K$	$H_4HEDP^{[38]}$ $\log K$
$[ZnL]$	$9,46 \pm 0,02$	$9,46^*$	$8,43^*$	$7,36^*$
$[ZnHL]$	$16,84 \pm 0,02$	$7,38^\dagger$	$4,37^\dagger$	$8,13^\dagger$
$[ZnH_2L]$	$21,71 \pm 0,01$	$4,87^\ddagger$	–	$5,46^\ddagger$
$[ZnH_3L]$	$23,08 \pm 0,02$	$1,37^\S$	–	–
$[Zn(OH)L]$	$-0,28 \pm 0,09$	$9,78^{**}$	–	–



Obr 3.18: Distribuční diagram komplexů H_5L^1 se Zn^{2+}

* $[ZnL]/[Zn][L]$

† $[ZnHL]/[ZnL][H]$

‡ $[ZnH_2L]/[ZnHL][H]$

§ $[ZnH_3L]/[ZnH_2L][H]$

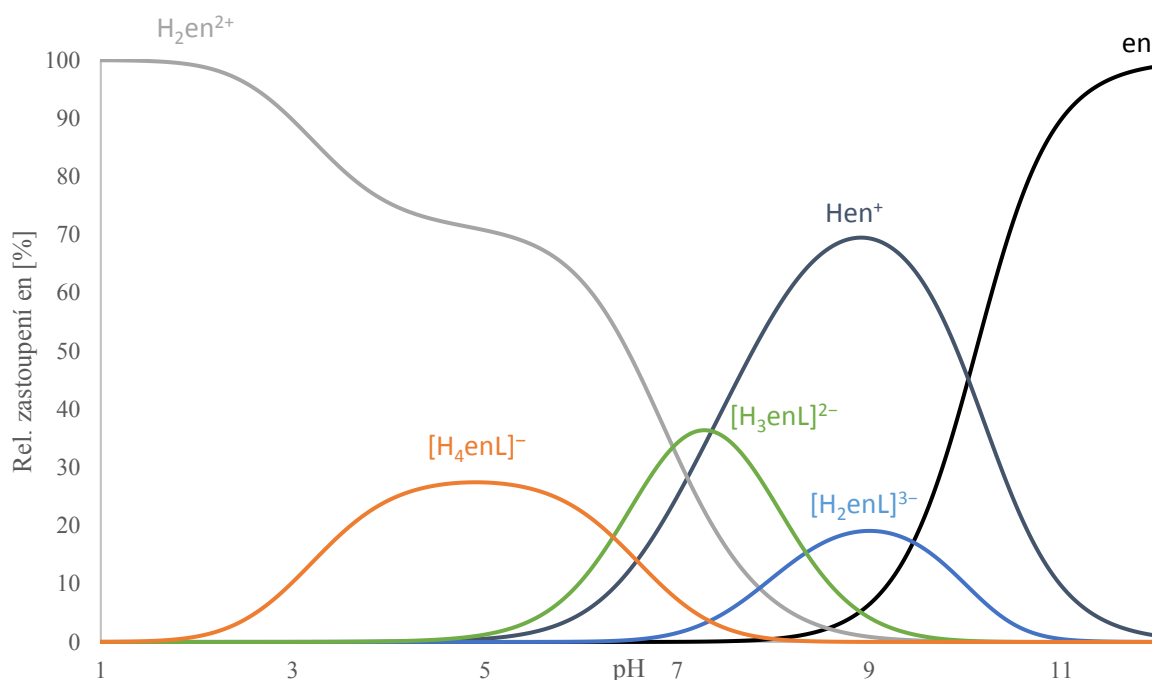
** $[ZnL]/[Zn(OH)L][H]$

Ve všech systémech studovaného ligandu s ionty kovů pozorujeme vyšší formační konstanty částice $[ML^1]$ než u porovnávaných ligandů. To je způsobeno vyšší bazicitou ve srovnání s H_5TP a vyšší denticitou ve srovnání s H_4MBP a H_4HEDP . Zároveň pro většinu kovů pozorujeme stabilizaci hydroxokomplexů, které u srovnávaných ligandů známy nejsou (s výjimkou Ca^{2+} , kde je situace opačná).

III.3.6 Interakce H_5L^1 s ethylendiaminem

Interakce nukleotidů s různými lineárními aminy a kationty dvojmocných kovů v ternárních systémech byly studovány s cílem odhalit biologické mechanismy, které probíhají v buňkách například při formaci dvoušroubovice DNA^[39]. Cílem většiny prací bylo zjištění konstant stability jak ternárních komplexů $ATP/M^{2+}/amin$, tak aduktů $ATP/amin$. V systémech byly používány lineární polyaminy jako 3,3,3-tet, spermin nebo putrescein. V této práci byla sledována interakce s ethylendiaminem pomocí NMR titrace a potenciometrického měření. Při potenciometrické titraci byla sledována interakce látek v poměru 1:1, program OPIUM pracoval s disociačními konstantami H_5L^1 i ethylendiaminu, které byly určeny v předchozích měření. Podle spočteného modelu dochází k interakci (obr. 3.19). Určit místa protonizace pouze z potenciometrické titrace není možné. V systému se od $pH = 2$ vyskytuje částice obsahující 4 protony $[H_4enL^1]^-$. Dalším zvyšováním pH dochází k deprotonizaci této částice za vzniku $[H_3enL^1]^{2-}$ a $[H_2enL^1]^{3-}$ (tab 3.12). V roztoku je v celém rozsahu měření přítomen volný ethylendiamin v protonizačních stavech odpovídajících pH , adukt s H_5L^1 tedy nevzniká nikdy ze 100 %. Interakce je tedy slabší než např. s měďnatými kationty.

Simulace titrační křivky pro systém $en-H_5L^1$, ve kterém nedochází k žádné interakci, porovnaná s reálnou titrační křivkou (obr. 3.21) potvrzuje myšlenku, že interakce ustává se zvyšujícím se pH a s ním související deprotonizací ethylendiaminu.



Obr. 3.19: Distribuční diagram částic vznikajících v roztoku při interakci en: H_5L^1 v poměru 1:1

Kromě potenciometrické titrace byla provedena i série NMR experimentů s cílem sledovat interakce H_5L^1 s ethylendiaminem. Byla provedena titrace v poměru 1:1, pH bylo upravováno pomocí HCl a NMe_4OH , aby bylo data možné srovnat s potenciometrickou titrací. Protože byl experiment prováděn v H_2O , byly sledovány pouze signály $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR. Pro srovnání byla také provedena NMR titrace H_5L^1 ve stejném systému a o stejné koncentraci. Průběhy závislosti chemických posunů na pH jsou vyneseny v obr. 3.20. V grafech je vidět, že do hodnoty $\text{pH} = 6$ jsou signály fosfonátů aduktů $[\text{H}_n\text{enL}^1]^{(5-n)-}$ posunuté nad křivku titrace samotné H_5L^1 , tedy je na nich snižena elektronová hustota.

Tab. 3.12: Konstanty stability a protonizační konstanty částic v systému en– H_5L^1

	$\log \beta$	$\log K$
$[\text{H}_2\text{enL}^1]$	$22,22 \pm 0,033$	$2,0^*$
$[\text{H}_3\text{enL}^1]$	$30,56 \pm 0,023$	$3,23^\dagger$
$[\text{H}_4\text{enL}^1]$	$36,89 \pm 0,027$	$2,14^\ddagger$

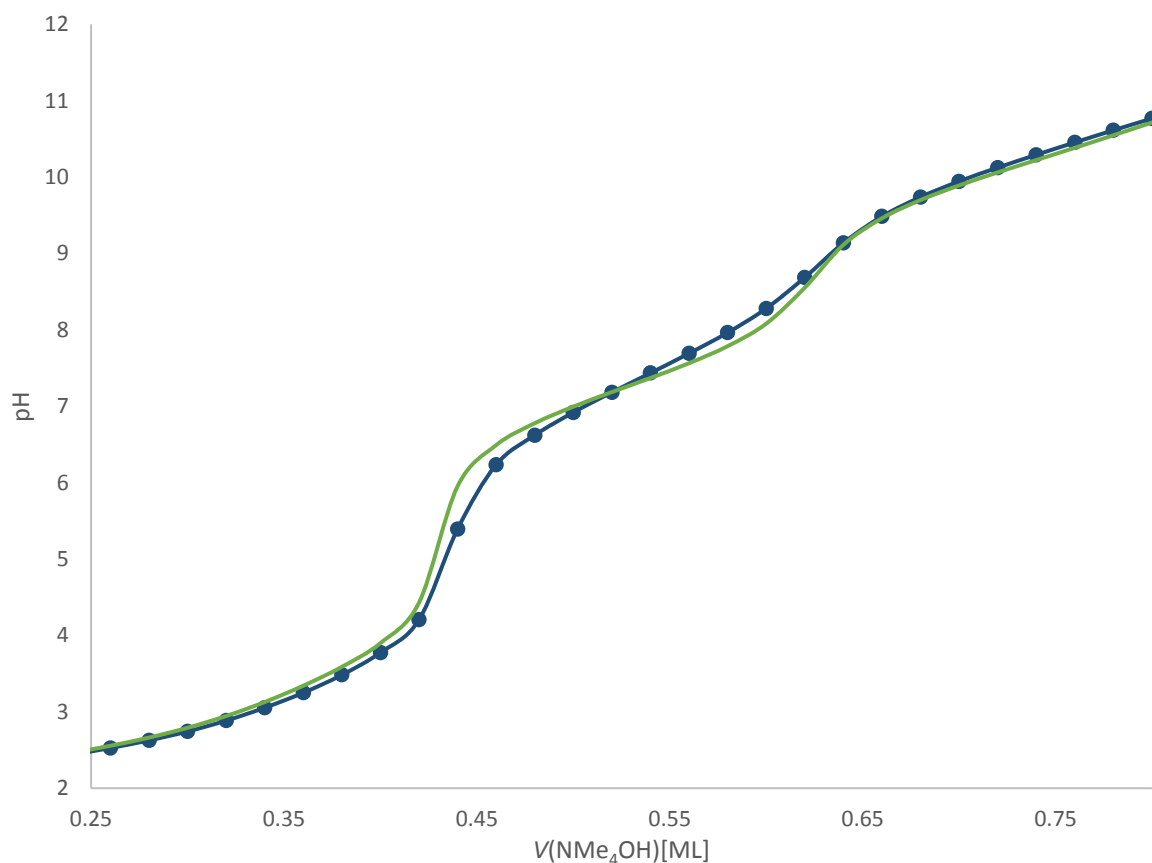
* $[\text{H}_2\text{enL}^1]/[\text{Hen}][\text{HL}^1]$

† $[\text{H}_3\text{enL}^1]/[\text{H}_2\text{en}][\text{HL}^1]$

‡ $[\text{H}_4\text{enL}^1]/[\text{H}_2\text{en}][\text{H}_2\text{L}^1]$

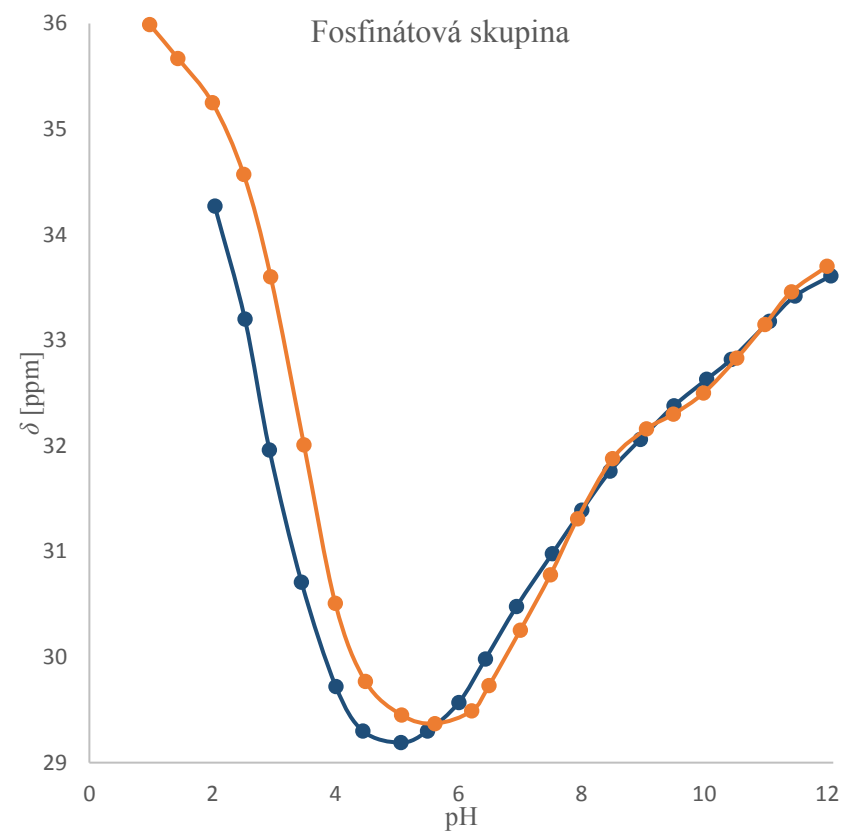
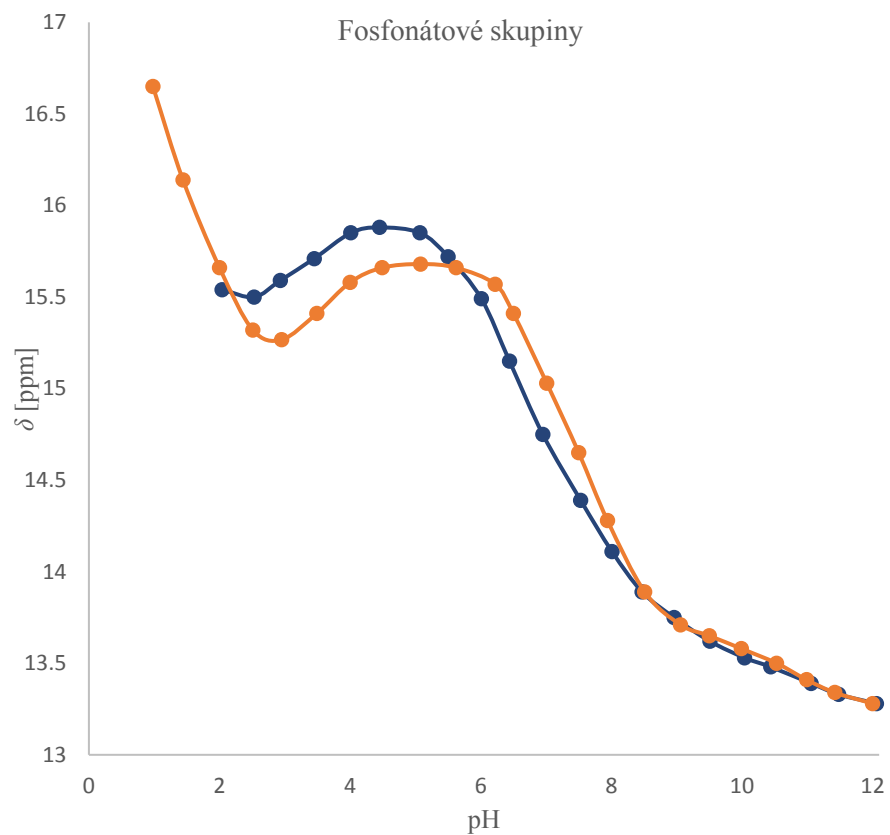
V případě titrace samotné kyseliny jsou pozorovány dobře rozlišené triplety a dublety v oblastech kolem pH 1, 6 a 12, tedy formy $(\text{H}_4\text{L}^1)^-$, $(\text{H}_2\text{L}^1)^{3-}$ a $(\text{L}^1)^{2-}$, tedy ty, kde jsou fosfonátové skupiny shodně protonizovány (příp. deprotonizovány). V případě interakce s ethylendiaminem dochází k objevování se definovaného tripletu a dubletů až v oblasti $\text{pH} > 10$, která dle potenciometrie koreluje s vymizením aduktů. V oblasti nižšího pH dochází pravděpodobně k dynamickým dějům, které pozorovatelné vzájemné štěpení jader ^{31}P ruší.

Určit konkrétní místa protonizace z dostupných dat však není možné. Je pravděpodobné, že v systému bude vnikat složitý systém vodíkových vazeb. K netriviálnímu chování protonů dochází i u kyseliny samotné. Ve srovnání s interakcemi lineárních polyaminů s ATP je interakce H_5L^1 slabší, v případě aduktů s molekulami obsahujícími dusíkaté báze totiž dochází k vytváření vodíkových vazeb mezi protonizovanými atomy dusíku aminu a atomy dusíku v aromatických jádrech.^[40] Tyto interakce jsou silnější a zároveň lépe definované. Fosfát molekuly ATP má menší vliv na celkovou stabilitu aduktů*.



Obr. 3.21: Porovnání reálné titrační křivky systému $\text{en-H}_5\text{L}^1$ v poměru 1:1 (modrá křivka) a simulace stejného systému bez interakcí (zelená křivka).

* Mimo jiné závisí i na tvaru lineárního polyaminu, jako první vzniká vazba mezi aromatickými heteroatomy a aminy. Vazba mezi fosfátem a aminem vzniká pouze, když má amin vhodný tvar.



Obr 3.20: Změna signálů ^{31}P -NMR v závislosti na pH pro systém en – H_5L^1 v poměru 1:1 (modrá křivka) a samotnou H_5L^1 (oranžová křivka)

IV. Závěr

Během studia cyklizačních reakcí bylo zjištěno, že i když cyklické produkty se strukturou PCPCP vznikají, dochází při cyklizaci alifatickými dibromidy k eliminačním reakcím vedoucím k bočním produktům obsahujícím řetězec s dvojnou vazbou. Tyto boční reakce spolu s množstvím izomerů cyklů představují zatím neřešitelný problém dělení reakčních směsí. V případě použití cyklizačních činidel neumožňujících eliminaci vnikají reakční směsi s jednodušším složením, ale jejich dělení je také zatím nemožné. Vznik dvojně vazby na methylenovém můstku při použití aldehydů či ketonů jako cyklizačních činidel pozorován nebyl.

Kyselina bis(methylenfosfonáto)fosfinová tvoří stabilnější komplexy jak s velmi tvrdými kovy I. a II. skupiny, tak s dvojmocnými přechodnými kovy než kyselina trifosforečná. V bazické oblasti se v námi studovaných systémech tvoří hydroxokomplexy, které u srovnávaných molekul pozorovány nebyly.

Studována byla také interakce s ethylendiaminem. I s touto částicí tvoří kyselina adukt, ale pouze pokud je ethylendiamin alespoň jednou protonizován. V komplexech dochází ke vzniku systému vodíkových vazeb, jejichž konkrétní podobu se rozlišit nepodařilo.

Seznam použité literatury

- [1] R. Noyori *et al.*, “Asymmetric hydrogenation of β -keto carboxylic esters. A practical, purely chemical access to β -hydroxy esters in high enantiomeric purity,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, no. 19, pp. 5856–5858, Sep. 1987.
- [2] A. M. Ho, M. D. Johnson, and D. M. Kingsley, “Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis,” *Science*, vol. 289, no. 5477, pp. 265–270, Jul. 2000.
- [3] S. D. McCulloch and T. A. Kunkel, “The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases,” *Cell Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 148–61, Jan. 2008.
- [4] H. Fleisch, “Diphosphonates: History and Mechanisms of Action - Journals - NCBI,” *Metab. Bone. Dis. Relat. Res*, vol. 3, pp. 279–287, 1981.
- [5] N. B. Watts, “Treatment of Osteoporosis with Bisphosphonates,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 27, no. 2, pp. 419–439, 1998.
- [6] V. Hengst, C. Oussoren, T. Kissel, and G. Sorm, “Bone targeting potential of bisphosphonate-targeted liposomes Preparation, characterization and hydroxyapatite binding in vitro,” *Int. J. Pharm.*, vol. 331, no. 2, pp. 224–227, Mar. 2007.
- [7] I. Fogelm, “The Bone Scan in Metabolic Bone Disease,” in *Bone Scanning in Clinical Practice*, vol. 3, London: Springer London, 1987, pp. 73–78.
- [8] R. G. G. Russell, N. B. Watts, F. H. Ebetino, and M. J. Rogers, “Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy,” *Osteoporos. Int.*, vol. 19, no. 6, pp. 733–759, Jun. 2008.
- [9] T. David, “Deriváty kyseliny methylen-bis(fosfonové) pro modifikaci biomolekul,” Diplomová práce, Univerzita Karlova, 2010.
- [10] S. Galluzzo *et al.*, “Immunomodulating role of bisphosphonates on human gamma delta T cells: an intriguing and promising aspect of their antitumour activity,” *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 11, no. 7, pp. 941–954, 2007.
- [11] E. Deutsch, K. Libson, S. Jurisson, and L. F. Lindloy, “Technetium Chemistry and Technetium Radiopharmaceuticals,” *Prog. Inorg. Chem.*, vol. 30, no. 75, 1983.
- [12] K. Gonzalez, “Synthesis and In vitro characterization of a tissue-Selective fullerene: vectoring C60(OH)16AMBP to mineralized bone,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 10, no. 6, Jun. 2002.
- [13] K. Ogawa *et al.*, “Development of a rhenium-186-labeled MAG3-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 16, no. 4, pp. 751–757, 2005.
- [14] C. Housecroft and A. Sharpe, *Anorganická Chemie*, 4th ed. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014.
- [15] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, “Biochemistry.” W H Freeman, 2002.
- [16] M. P. Abbracchio, G. Burnstock, A. Verkhratsky, and H. Zimmermann, “Purinergic signalling in the nervous system: an overview,” *Trends Neurosci.*, vol. 32, no. 1, pp. 19–29, Jan. 2009.
- [17] J. Šrein, “Organofosforové sloučeniny,” Bakalářská práce, Univerzita Karlova, 2015.
- [18] L. Maier, “Organische Phosphorverbindungen XXXVI. Darstellung und Eigenschaften von Bis-(dialkoxyposphonyl-methyl)-, Bis-(alkoxyphosphinyl-methyl)-und Bis-(oxophosphoranyl-methyl)-

- phosphinsäureestern sowie der entsprechenden Säuren,” *Helv. Chim. Acta*, vol. 52, no. 3, pp. 827–845, 1969.
- [19] S. D. Taylor, F. Mirzaei, and S. L. Bearne, “An unsymmetrical approach to the synthesis of bismethylene triphosphate analogues,” *Org. Lett.*, vol. 8, no. 19, 2006.
- [20] C. Bianchini, A. Meli, M. Peruzzini, F. Vizza, and F. Zanobini, “Tripodal polyphosphine ligands control selectivity of organometallic reactions,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 120, pp. 193–208, Nov. 1992.
- [21] I. V. Smirnov, “Anomalous effects in extraction of lanthanides and actinides with bidentate neutral organophosphorus extractants. Role of proton hydrate solvates,” *Radiochemistry*, vol. 49, no. 1, pp. 44–54, Feb. 2007.
- [22] M. Nogami, Y. Sugiyama, and Y. Ikeda, “Adsorptivity of silica-supported adsorbents impregnated with polyphosphine polyoxides to U(VI) and some other metal ions in nitric acid media,” *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 284, no. 1, 2010.
- [23] M. Herceg, B. Matkovic, and P. Bronzan-Planinić, “Bis[bis{(diphenylphosphinyl)methyl}ethyl phosphinate]bis(ethanol) copper(II) perchlorate: Synthesis, Crystal and Molecular Structure,” *Polyhedron*, vol. 5, no. 12, pp. 2013–2020, 1986.
- [24] P. Bronzan-Planinić and H. Meider, “Synthesis And Characterization Of Cobalt(II), Nickel(II) And Copper (II) Perchlorate Complexes With Bis [(Diphenylphosphinyl)Methyl]Phenylphosphine Oxide, Bis [(Diphenylphosphinyl)Methyl]Ethyl Phosphinate, And Bis [(Diphenylphosphinyl)Methyl] Phosphinic,” *Polyhedron*, vol. 2, no. 2, pp. 69–75, 1983.
- [25] J. McMurry, *Organická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004.
- [26] G. Jones, “The Knoevenagel Condensation,” in *Organic Reactions*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011, pp. 204–599.
- [27] E. T. Binderup, “Derivatives of Methylene-Bisphosphonic Acid, Process for their Preparation and a Pharmaceutical Compositionderivatives of Methylene-Bisphosphonic Acid, Process for their Preparation and a Pharmaceutical Composition,” 85903807, 1986.
- [28] A. H. Ford-Moore and J. H. Williams, “278. The reaction between trialkyl phosphites and alkyl halides,” *J. Chem. Soc.*, p. 1465, 1947.
- [29] J. P. Smits and D. F. Wiemer, “Synthesis and reactivity of alkyl-1,1,1-trisphosphonate esters,” *J. Org. Chem.*, vol. 76, no. 21, pp. 8807–13, Nov. 2011.
- [30] C. R. Degenhardt and D. C. Burdsall, “Synthesis of Ethenylidenebis(phosphonic acid) and Its Tetraalkyl Esters,” *J. Org. Chem.*, vol. 51, pp. 3488–3490, 1986.
- [31] W. Lehnert, “Knoevenagel kondensationen mit TiCl₄/base-IV,” *Tetrahedron*, vol. 30, no. 2, pp. 301–305, 1974.
- [32] G. M. Sheldrick, “Program for Crystal Structure Solution from Diffraction Data.” University of Göttingen, Göttingen, 1997.
- [33] G. M. Sheldrick, “Program for Crystal Structure Refinement from Diffraction Data.” University of Göttingen, Göttingen, 2014.
- [34] P. Wenig and J. Odermatt, “OpenChrom: a cross-platform open source software for the mass spectrometric analysis of chromatographic data.” 2010.

- [35] A. E. Martell and R. M. Smith, "Critical Stability Constants," in *NIST Standard Reference Database 46*, Version 7., New York: Plenum Press, 2003.
- [36] M. Kývala and I. Lukeš, "Chemometrics'95." Pardubice, 1995.
- [37] F. W. Gilmore and J. H. Huber, "Base-Catalyzed Condensation of Aldehydes with Ethyl Bis(diethylphosphonomethyl)phosphinate," *J. Org. Chem.*, vol. 38, no. 7, pp. 1423–1424, 1973.
- [38] E. Rizkalla, "Metal chelates of phosphonate-containing ligands—V Stability of some 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic acid metal chelates," *Talanta*, vol. 27, no. 9, pp. 715–719, Sep. 1980.
- [39] A. Gasowska, "Interaction centres of pyrimidine nucleotides: Cytidine-5'-diphosphate (CDP) and cytidine-5'-triphosphate (CTP) in their reactions with tetramines and Cu(II) ions," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 99, no. 8, pp. 1698–1707, 2005.
- [40] L. Lomozik, A. Gasowska, G. Krzysko, and R. Bregier-Jarzebowska, "Coordination Reactions and Noncovalent Interactions of Polyamines with Nucleotides in Binary Systems and with Nucleotides and Copper(II) Ion in Ternary Systems," *Bioinorg. Chem. Appl.*, vol. 2010, pp. 1–13, 2010.

Poděkování

Závěrem této práce bych chtěl poděkovat všem, kteří mi s jejím vytvořením nějak pomohli. Určitě se mi nepodaří připomenout všechny, ale velký dík patří především mému školiteli, který mě byl schopen a ochoten dotlačit k jejímu dokončení. Neméně velký dík patří mým rodičům a zbytku rodiny, která mě motivovala k práci v době, kdy měl můj školitel jiné starosti.

Velký dík náleží také doktorce Císařové za měření krystalových struktur na poslední chvíli a doc. Kotkovi za zpracování těchto struktur. Stejně tak Mgr. Böhmové za intenzivní kurz potenciometrické titrace a neustálou podporu, jak při měření, tak při následujících výpočtech.

A samozřejmě nemohu zapomenout na kolektiv laboratoře č. 19, který mi byl po dobu vzniku práce jak odbornou, tak morální podporou.